



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA PERCICOTE

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE ÁCIDO RETINÓICO, CRABP2, NFκB
p100 E p105, TRAP1 E TWEAK EM NEFROBLASTOMAS**

CURITIBA

2017

ANA PAULA PERCICOTE

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE ÁCIDO RETINÓICO, CRABP2, NFκB
p100 E p105, TRAP1 E TWEAK EM NEFROBLASTOMAS**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra Lúcia de Noronha

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Percicote, Ana Paula

Expressão imunohistoquímica de ácido retinóico, CRABP2, NFkB P100 e p105, TRAP1 e TWEAK em nefroblastomas. / Ana Paula Percicote. – Curitiba, 2015.

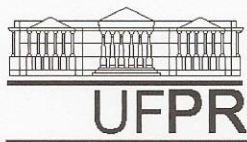
113 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Lúcia de Noronha

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Nefroblastoma 2. Tretinoína I. Título II. Noronha, Lucia de III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.8212
616.99461



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

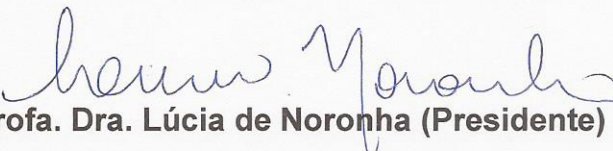
TERMO DE APROVAÇÃO

**“Expressão imunoistoquímica de ácido retinóico,
CRABP2, NFκB p100 e p105, TRAP1 e TWEAK em
nefroblastomas”**

por


Ana Paula Percicote

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**


Prof. Dra. Lúcia de Noronha (Presidente)


Prof. Dra. Ana Paula Martins Sebastião


Prof. Dr. Luiz Martins Collaço


Prof. Dr. Sérgio Ossamu Ioshi


Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres

Curitiba, 30 de junho de 2017.

RESUMO

O nefroblastoma, ou tumor de Wilms, é a neoplasia renal mais freqüente na infância correspondendo a 98% dos tumores renais nesta faixa etária. Apesar do prognóstico favorável uma parcela dos pacientes evolui para recidiva e óbito. Biomarcadores atuantes na progressão tumoral, proliferação, diferenciação, apoptose e recentemente descrita ação na resposta imune e inflamação, tais como ácido retinóico (AR), CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK tem sido descritos. Este estudo tem por objetivo a avaliação da expressão imunoistoquímica de ácido retinóico (AR), CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK em amostras parafinadas de nefroblastomas correlacionando-a com fatores prognósticos. Foram selecionados 77 espécimes de nefroblastoma provenientes de serviços de patologia. A imunoexpressão foi avaliada através de análise semiquantitativa e quantitativa. Para a análise semiquantitativa empregou-se o sistema escore de Allred e para a avaliação quantitativa, a análise morfométrica da área corada. Para a comparação de dois grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, enquanto para a comparação de três ou mais grupos utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A imunopositividade para AR, CRABP2, NFκB p100/52 e NFκB p105/50 foi encontrada tanto no núcleo quanto citoplasma. A imunoexpressão de TRAP1 e TWEAK esteve presente apenas no citoplasma das células cancerosas. Todos os tipos histológicos do nefroblastoma (blastema, epitélio e estroma) foram positivos para as seis proteínas estudadas. AR pela análise morfométrica e CRABP2 pela análise semiquantitativa apresentaram maior expressão imunoistoquímica nos pacientes com metástase ($p=0.0247$ e $p=0.0128$, respectivamente). Semelhante ao encontrado em relação à análise quantitativa de AR que apresentou maior imunopositividade em amostras tumorais submetidas a quimioterapia pré-cirúrgica ($p=0.0330$). Observou-se a maior expressão de NFκB p105/50 em nefroblastomas em estágio I/II ($p=0.0415$). NFκB p105/50 e TRAP1 através da análise semiquantitativa e TWEAK de acordo com análise quantitativa, apresentaram menor positividade em nefroblastomas tipo blastematoso ($p=0.046$, $p=0.003$ e $p=0.066$, respectivamente). A anaplasia se associou a maior escore total de Allred de TRAP1 ($p=0.005$). Não houve correlação estatística da imunoexpressão dos marcadores estudados, comprometimento nodal e evolução clínica. A análise semiquantitativa e quantitativa dos marcadores AR, CRABP2, NFκB p105/p50, TRAP1 e TWEAK apontam para potenciais biomarcadores para progressão tumoral e para a participação destas proteínas na tumorigênese do nefroblastoma.

Palavras-chave: nefroblastoma; ácido retinóico; CRABP2; NFκB; TRAP1; TWEAK.

ABSTRACT

Nephroblastoma, or Wilms' tumor, is the commonest renal cancer in children and accounts for about 98% of renal tumors in this age group. Despite of the favorable prognosis, a parcel of patients evolved to tumor relapse and death. Biomarkers acts in tumor progression, proliferation, differentiation, apoptosis and the most recent described immune and inflammation response action, as retinoic acid (RA), CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 and TWEAK. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of RA, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 and TWEAK in paraffin-embedded samples of nephroblastomas to determine whether expression correlates with prognostic factors. A total of 77 specimens from pathology services were selected. The immunoexpression was evaluated through semiquantitative and quantitative analysis. For the semiquantitative analysis, the Allred score system was used and for the quantitative evaluation, the morphometric analysis of the stained area was applied. For the comparison of two groups, the non-parametric test of Mann-Whitney was used, while for the comparison of three or more groups the Kruskal-Wallis nonparametric test was used. Immunopositivity to RA, CRABP2, NFkB p100/52 and NFkB p105/50 was found in the nucleus and cytoplasm. Immunoexpression of TRAP1 and TWEAK was present only in the cytoplasm of cancer cells. All histological types of nephroblastoma (blastema, epithelium and stroma) were positive for the six proteins studied. RA morphometric analysis and CRABP2 semiquantitative analysis presented higher immunohistochemical expression in patients with metastasis ($p= 0.0247$ and $p= 0.0128$, respectively). This is similar to the results of the quantitative analysis of RA, which showed greater immunopositivity in tumor samples of patients subjected to pre-surgical chemotherapy ($p= 0.0330$). The highest expression of NFkB p105/50 was observed in stage I/II nephroblastomas ($p= 0.0415$). NFkB p105/50 and TRAP1 semiquantitative analisys and TWEAK quantitative analisys presented lower positivity in nephroblastomas blastematal type ($p= 0.046$, $p= 0.003$ and $p= 0.066$, respectively). Anaplasia were associated with high TRAP1 total Allred score ($P= 0.005$). No significant correlation was found between the markers and variables studied, such as nodal involvement, and clinical evolution. The semiquantitative and quantitative analysis of RA, CRABP2, NFkB p100/p52, NFkB p105/p50, TRAP1 and TWEAK point to potential biomarkers for tumor progression and for the participation of these proteins in nephroblastoma tumorigenesis.

Key words: nephroblastoma; retinoic acid; CRABP2; NFkB; TRAP1; TWEAK.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	MACROSCOPIA DO NEFROBLASTOMA.....	15
FIGURA 2 –	HISTOLOGIA DO NEFROBLASTOMA.....	16
FIGURA 3 –	COMPONENTE BLASTEMATOSO DO NEFROBLASTOMA...	17
FIGURA 4 –	DIFERENCIAÇÃO RABDOMIOBLÁSTICA DO COMPONENTE ESTROMAL DO NEFROBLASTOMA.....	17
FIGURA 5 –	COMPONENTE EPITELIAL DO NEFROBLASTOMA.....	18
FIGURA 6 –	NEFROBLASTOMA COM ANAPLASIA.....	19
FIGURA 7 –	MODELO QUE DEFINE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DUPLA DO AR.....	33
FIGURA 8 –	VIAS SINALIZADORAS CANÔNICA, NÃO CANÔNICA E ATÍPICA DO NFκB.....	38
FIGURA 9 –	TRAP1 CHAPERONA MITOCONDRIAL.....	43
FIGURA 10 –	SINALIZAÇÃO DO FN14 TWEAK-DEPENDENTE.....	47
FIGURA 11 –	FUNÇÕES AUTÓCRINA, PARÁCRINA E JUSTÁCRINA DO TWEAK.....	49

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	CONDIÇÕES COM RISCO AUMENTADO DE NEFROBLASTOMA.....	14
QUADRO 2 –	<i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE WORKING CLASSIFICATION OF RENAL TUMORS.....</i>	25
QUADRO 3 –	CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA SUBCLASSIFICAR TUMORES DE WILMS SEGUNDO <i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE 2001.....</i>	25
QUADRO 4 –	ESTADIAMENTO SEGUNDO A <i>SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D’ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE</i> E A <i>NATIONAL WILMS TUMOR STUDY.....</i>	28

LISTA DE SIGLAS

AR	- ácido retinóico
ATM	- ataxia telangiectasia mutada
BAFFR	- fator de ativação da célula B
CRABP	- proteína celular ligada ao ácido retinóico
Cyp-D	- ciclofilina D
COG	- <i>Children's Oncology Group</i>
DAB	- 3,3' - diaminobenzidina
FABP5	- proteína ligante de ácido graxo 5
GCBTTW	- Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms
GRP94	- proteína reguladora de glicose 94
GPO	- <i>German Pediatric Oncology</i>
HIF1 α	- fator induzido por hipóxia 1 α
HSPs	- proteínas do choque térmico
I κ B	- proteínas inibitórias do NF κ B
IKK	- complexo I κ B quinases
IL-1R	- receptor de interleucina 1
JWiTS	- <i>Japan Wilms Tumor Study</i>
LT β R	- receptor β da linfoxina
NEMO ou IKK γ	- Modulador essencial do NF κ B
NF κ B	- fator nuclear kappa B
NIK	- quinase indutora de NF κ B
NWTS	- <i>National Wilms Tumor Study</i>
NWTSG	- <i>National Wilms Tumor Study Group</i>
OXPHOS	- fosforilação oxidativa
PINK1	- putativa quinase-1 induzida por PTEN
PPAR β/δ	- receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta/delta
RALDH	- retinaldeído desidrogenase
RANK	- receptor ativador do NF κ B
RAR	- receptor do ácido retinóico

RARE	- elemento de resposta ao ácido retinóico
Rb	- Retinoblastoma
RBP	- proteínas ligantes de retinol
Rel	- família reticuloendoteliose
RHD	- domínio de homologia Rel
ROR β	- receptor órfão beta relacionado ao ácido retinóico
RXR	- receptor retinóide X
SDH	- succinato desidrogenase
SFOP	- <i>French Société d'Oncologie Pédiatrique</i>
SIOP	- <i>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique</i>
STRA6	- gene estimulado pelo ácido retinóico 6
VEGF	- fator de crescimento endotelial vascular
TLRs	- receptores Toll-like
TNF	- fator de necrose tumoral
TNFR	- receptor fator de necrose tumoral
TNFSF	- superfamília do TNF
TNFRSF	- superfamília dos receptores do TNF
TRAF	- fator associado ao receptor TNF
TRAP1	- proteína 1 associada ao fator de necrose tumoral
TWEAK	- fator de necrose tumoral símile fraco indutor de apoptose
UKCCSG	- <i>United Kingdom Children's Cancer Study Group</i>
VHL	- Von Hippel Lindau

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1. 1	HISTÓRICO.....	9
1. 2	EPIDEMIOLOGIA.....	10
1. 3	PATOGÊNESE.....	11
1. 4	APRESENTAÇÃO CLÍNICA E ANOMALIAS CONGÊNITAS ASSOCIADAS.....	13
1. 5	ANATOMIA PATOLÓGICA.....	14
1. 5. 1	Macroscopia.....	14
1. 5. 2	Microscopia.....	15
1. 6	SEQÜELAS DO TRATAMENTO.....	20
1. 7	RECORRÊNCIA TUMORAL.....	22
1. 8	FATORES PROGNÓSTICOS.....	22
1. 8. 1	Idade.....	23
1. 8. 2	Grupo de risco.....	24
1. 8. 3	Estadiamento.....	26
1. 8. 4	Aspectos histológicos relevantes para o prognóstico.....	28
1. 8. 5	Peso tumoral.....	29
1. 8. 6	Variáveis de microestadiamento.....	29
1. 9	A imunoistoquímica.....	30
1. 10	MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS.....	32
1. 10. 1	Ácido retinóico.....	32
1. 10. 2	Fator nuclear kappa B.....	36
1. 10. 3	Proteína 1 associada ao fator de necrose tumoral.....	41
1. 10. 4	Fator de necrose tumoral símile fraco indutor de apoptose.....	46
2	JUSTIFICATIVA.....	50
3	OBJETIVOS.....	51
3. 1	OBJETIVO GERAL.....	51
3. 2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4	ARTIGOS.....	53
5	CONCLUSÃO.....	87

REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE.....	105
ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER.....	109
ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CRIANÇAS CÉSAR PERNETTA E HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O nefroblastoma ou embrioma renal foi descrito inicialmente por Hunter em 1793, seguido por Hance, em 1814 (BECKWITH *et al.*, 1996).

O nefroblastoma recebeu o epônimo de tumor de Wilms após a publicação da monografia intitulada “*Die Mischgeschwülste der Niere*” do cirurgião alemão Carl Max Wilherm Wilms, em 1899, que reconheceu as similaridades entre o tecido embrionário renal e o nefroblastoma (WILMS, 1899).

Os primeiros grandes avanços no tratamento do nefroblastoma surgiram nas décadas de 30 e 50, com o emprego de modalidades terapêuticas como nefrectomia, radioterapia e quimioterapia no tratamento desta neoplasia (LEMERLE *et al.*, 1976; LEMERLE *et al.*, 1983).

Os progressivos avanços no tratamento do nefroblastoma resultaram da formação de grupos cooperativos internacionais na Europa, Estados Unidos e Canadá que incorporaram abordagens terapêuticas multimodais. Os resultados marcantes no controle do nefroblastoma foram brindados com concomitante redução no tratamento para determinados subgrupos de pacientes, acarretando não apenas em maior número de pacientes sobreviventes, mas sobreviventes mais saudáveis (DOME; PERLMAN; GRAF, 2014).

Concomitantemente aos avanços terapêuticos, conhecimentos da epidemiologia e de aspectos clínicos, anatomopatológicos e moleculares do nefroblastoma passaram a ser investigados e difundidos. Novos fatores de risco foram adicionados aos já existentes buscando-se melhor estratificação de risco e refinamento terapêutico (DOME; PERLMAN; GRAF, 2014).

Os resultados obtidos por grupos cooperativos, em especial o norte americano, incentivaram a formação do Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW), em 1986, fundado com o objetivo de estudar as características epidemiológicas e fatores prognósticos dos nefroblastomas na população brasileira (DE CAMARGO; FRANCO, 1994).

Entre os grupos cooperativos internacionais mais expressivos estão a *Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique* (SIOP) composto por diversos países europeus, *Children’s Oncology Group* (COG) que sucedeu o *National Wilms Tumor*

Study Group (NWTSG) que envolve os Estados Unidos e Canadá, *United Kingdom Children's Cancer Study Group* (UKCCSG), *German Pediatric Oncology* (GPO), *French Société d'Oncologie Pédiatrique* (SFOP) e *Japan Wilms Tumor Study* (JWiTS) (KALAPURAKAL *et al.*, 2004).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

O nefroblastoma é a neoplasia renal mais comum na faixa etária pediátrica e corresponde a 5 a 7% dos cânceres pediátricos e a 98% dos cânceres renais em crianças (BRESLOW *et al.*, 1993; STILLER; PARKIN, 1996).

A incidência e o comportamento dos nefroblastomas são variáveis entre os grupos étnicos. A incidência anual em caucasianos é de aproximadamente 6-9 casos por milhão de habitantes. Em algumas séries da África Subsaara e Nigéria a incidência de nefroblastoma está acima de 10 casos por milhão, semelhante à encontrada para a população negra nos Estados Unidos (STILLER; PARKIN, 1990). Estudos recentes apontam para um tipo biológico diverso de nefroblastoma na África Subsaara com agressividade biológica e resistência ao tratamento (MURPHY, *et al.*, 2012; LIBES, *et al.*, 2014). Esta notável diferença na incidência mundial do nefroblastoma acompanha uma distribuição étnica (STILLER; PARKIN, 1996). O papel da geografia na distribuição dos casos sugere que os riscos ambientais exerçam menor influência sobre sua etiologia (BRESLOW *et al.*, 1993).

A incidência relatada entre os sexos é variável (BRESLOW *et al.*, 1993). Alguns estudos mostram discreto predomínio no sexo feminino (BRESLOW *et al.*, 1993; BRESLOW *et al.*, 1988). A distribuição entre os sexos segundo dados do Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Nefroblastoma para a população brasileira é semelhante ao encontrado no *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* e *National Wilms Tumor Study Group* (razão masculino:feminino de 0,83) (PASTORE *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1994).

A manifestação inicial do nefroblastoma ocorre em 80% dos casos antes dos cinco anos de idade (BRESLOW *et al.*, 1988). A idade média ao diagnóstico varia de 2,9 a 3,1 anos (WEIRICH *et al.*, 2004; BRESLOW *et al.*, 1993; REINHARD *et al.*, 2008). Alguns fatores parecem contribuir para a variação da idade ao diagnóstico. Entre estes fatores estão: o sexo, a etnia, malformações associadas e a lateralidade. Os pacientes do sexo masculino quando diagnosticados são de 6 a 10 meses mais

jovens que pacientes do sexo feminino (FRANCO *et al.*, 1991; BRESLOW *et al.*, 1988; DUMOUCÉL *et al.*, 2014). Os tumores bilaterais são diagnosticados até um ano antes quando comparados aos tumores unilaterais ou multicêntricos e têm maior frequência de associação com anomalias congênitas (PASTORE *et al.*, 1988; BRESLOW *et al.*, 1988). Pacientes com malformações apresentam idade ao diagnóstico inferior (DUMOUCÉL *et al.*, 2014). Além da influência destes fatores sobre a idade ao diagnóstico, sabe-se que pacientes mais velhos são diagnosticados em estádios clínicos mais avançados (FRANCO *et al.*, 1991).

O nefroblastoma está associado a anomalias congênitas, em especial a anomalias do trato genitourinário e hemihipertrofia (BRESLOW; BECKWITH, 1982). Há relatos de nefroblastoma familiar em aproximadamente 1-2% dos casos (BRESLOW *et al.*, 1993).

1.3 PATOGÊNESE

O nefroblastoma é um paradigma da heterogeneidade e complexidade genética (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008). Há a identificação de pelo menos dez genes envolvidos em sua patogênese. Muitos dos quais estão associados a síndromes genéticas (BRESLOW *et al.*, 2006).

Os nefroblastomas são distinguidos por sua morfologia complexa que reflete os inúmeros eventos genéticos coordenados que participam da nefrogênese (BECKWITH, 1998). Semelhante ao encontrado em outros tumores, o nefroblastoma também é caracterizado por alterações em genes que regulam o crescimento, diferenciação e proliferação celular (DOME; COPPES, 2002; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A primeira evidência de que loci cromossômicos específicos estão associados com nefroblastomas foi a identificação de deleções intersticiais no 11p13 em pacientes com nefroblastoma e com síndrome de Denys-Drash. Este gene denominado de *gene do tumor de Wilms 1 (WT1)* foi isolado e sequenciado. O segundo locus identificado está localizado no cromossomo 11p15.5, denominado *gene do tumor de Wilms 2 (WT2)*. Alterações cromossômicas neste locus são descritas em pacientes com síndrome de Beckwith-Weidemann (GREEN *et al.*, 1996).

Outros dois genes, *WTX* (*gene do tumor de Wilms no X*) e *CTNNB1*, parecem estar envolvidos na patogênese do nefroblastoma. O *CTNNB1*, que codifica a β -catenina, apresenta mutações em aproximadamente 15% dos nefroblastomas e, em geral, está acompanhado de mutações do *WT1*. Enquanto o *WTX* encontrado em 11% a 29% dos casos ocorre com ou sem mutações do *WT1*. Aproximadamente um terço dos nefroblastomas carrega mutações do *WT1*, *CTNNB1* e/ou *WTX*. Uma das hipóteses para a tumorigênese do nefroblastoma sugere que a inativação da via Wnt através da mutação do *CTNNB1*, *WTX* ou outro componente da via Wnt, como *WT1* é necessária para desencadear o processo (RUTESHOUSER; ROBINSON; HUFF, 2008).

Mutações do *WT1* foram encontradas em pequeno número de famílias com esta neoplasia (DOME; COPPES, 2002). Foram identificados dois genes relacionados aos casos familiares de nefroblastoma: o *FWT1*, localizado no cromossomo 17q12-21, e o *FWT2*, localizado no cromossomo 19q13 (RAPLEY *et al.*, 2000). Porém, em alguns casos de nefroblastoma familiar não se observou correlação com *WT1*, *FWT1* ou *FWT2*, sugerindo que outros genes participem da susceptibilidade em casos de nefroblastoma familiares (DOME; COPPES, 2002).

Algumas síndromes de predisposição hereditária ao câncer como mutações do *BRCA2* e Li-Fraumeni estão associadas à predisposição para nefroblastomas (HIRSCH *et al.*, 2004; HARTLEY *et al.*, 1993).

Mutações no *gene supressor tumoral p53*, localizado no cromossomo 17p, também são relatadas especificamente nas áreas de anaplasia. A aquisição de mutações restritas às áreas de anaplasia sugere que estas mutações estariam relacionadas ao processo de progressão para anaplasia (DOME; COPPES, 2002).

Análises citogenéticas revelaram anormalidades cromossômicas recorrentes em nefroblastomas. Entre as alterações encontradas 14,6% dos nefroblastomas com histologia favorável apresentaram perda da heterozigose do cromossomo 16q, 10,3% perda da heterozigose do cromossomo 1p e 2,6% perda da heterozigose do 16q e 1p. O *United Kingdom Children's Cancer Study Group- 3* e o *National Wilms Tumor Study- 5* relataram a alta prevalência da perda da heterozigose do 16q, principalmente em tumores com anaplasia, sugerindo o envolvimento do 16q na tumorigênese do nefroblastoma (GRUNDY *et al.*, 2005; MESSAHEL *et al.*, 2009). A correlação entre perda da heterozigose do 16q e anaplasia difusa também foi

relatada em pacientes tratados segundo a *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (WITTMANN *et al.*, 2007).

A perda da heterozigose do 16q e 1p, descrita em aproximadamente 5% dos pacientes com histologia favorável, se correlaciona a maior risco de recaída ou óbito. Os efeitos da função destes genes sobre a sobrevida em pacientes estádios I e II, tratados menos intensamente pelo *National Wilms Tumor Study- 5* sugerem que estes genes atuem sobre a habilidade das células tumorais em tolerar os agentes quimioterápicos ou a radioterapia. A importância de tal anormalidade cromossômica está relacionada ao fato de que pacientes com perda da heterozigose do 16q e 1p e redução significativa da sobrevida livre de doença podem ser beneficiados com a intensificação do tratamento quimioterápico (GRUNDY *et al.*, 2005).

O ganho do 1q, presente em 19% dos nefroblastomas, é considerado uma das anormalidades citogenéticas mais comuns nestes tumores. É considerado um marcador molecular de pior prognóstico independente do estágio e do tipo histológico (SERGERS *et al.*, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado o papel do microRNA em nefroblastomas. Mutações de DROSHA foram descritas em 12% dos nefroblastomas (TORREZAN *et al.*, 2014).

1.4 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E ANOMALIAS CONGÊNITAS ASSOCIADAS

O sintoma inicial mais comum em pacientes com nefroblastoma é massa abdominal e aumento do volume abdominal com frequência relatado pelos pais. Sintomas como dor abdominal, anorexia, vômito ou uma combinação destes sintomas estão presentes em um terço dos pacientes (GREEN *et al.*, 1996; KALAPURAKAL *et al.*, 2004). Apresentação clínica aguda com necessidade de cirurgia de emergência, hematúria macroscópica e hipertensão também são relatadas (LEMERLE *et al.*, 1976).

Há uma grande variedade de síndromes genéticas e anormalidades cromossômicas associadas ao nefroblastoma. Malformações e síndromes predisponentes podem ser encontradas em 17,6% dos pacientes (DUMOUCÉL *et al.*, 2014). Esta variabilidade genética reflete a diversidade molecular envolvida na tumorigênese do nefroblastoma (SCOTT *et al.*, 2006). Os nefroblastomas bilaterais

estão presentes com maior frequência em pacientes portadores de anormalidades genéticas (NG *et al.*, 2007).

Estas condições podem ser divididas conforme o risco de desenvolver nefroblastoma em alto risco (> 20%), risco moderado (5-20%) e baixo risco (< 5%) (SCOTT *et al.*, 2006). Estas condições podem ser divididas em quatro grupos: desordens associadas a genes no cromossomo 11p13, nefroblastoma familiar, síndromes de supercrescimento e defeitos no reparo do DNA, como descritos no QUADRO 1 (SCOTT *et al.*, 2006; NG *et al.*, 2007).

QUADRO 1 – CONDIÇÕES COM RISCO AUMENTADO DE NEFROBLASTOMA

ALTO RISCO (> 20%)
<ul style="list-style-type: none"> • Deleções do WT1 (incluindo síndrome WARG) • Mutações missense do WT1 (incluindo síndrome Denny-Drash) • Nefroblastoma familiar • Síndrome de Perlman • Aneuploidia variegada em mosaico • Anemia de Fanconi/ Mutações bialélicas do BRCA2
RISCO MODERADO (5 – 20%)
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Frasier (mutação splice WT1 no intron 9) • Síndrome de Beckwith-Wiedemann • Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel
BAIXO RISCO (< 5%)
<ul style="list-style-type: none"> • Hemihipertrofia isolada* • Síndrome de Bloom • Síndrome de Li-Fraumeni/ Síndrome de Li-Fraumeni similar • Síndrome do hiperparatireoidismo hereditário – tumor maxilar • Nanismo Mulibrey • Trissomia do 18 • Trissomia do 13 • Deleções do 2q37

FONTE: SCOTT *et al.* (2006).

LEGENDA: * Pacientes com hemihipertrofia causada por dissomia uniparental do 11p15 ou metilação isolada H19 são risco moderado para nefroblastoma.

1.5 ANATOMIA PATOLÓGICA

1.5.1 MACROSCOPIA

A macroscopia o nefroblastoma geralmente é caracterizado por massa única, sólida, arredondada, de tamanho variável, bem delimitada do tecido renal adjacente por pseudocápsula. Superfície de corte da lesão é heterogênea com coloração variando de branco-acinzentada, acastanhada ou rósea e consistência macia (FIGURA 1). Tumores com predomínio estromal são firmes. A lesão com frequência é subdividida por septos proeminentes, conferindo aspecto lobulado à macroscopia.

Espaços císticos, hemorragia e necrose podem estar presentes. Os tumores podem ser multicêntricos e bilaterais (BECKWITH, 1998).

FIGURA 1 - MACROSCOPIA DO NEFROBLASTOMA



Legenda: Tumor circundado por pseudocápsula composto por tecido branco-acastanhado e macio com focos de hemorragia e cavidades císticas.
FONTE: o autor (2013).

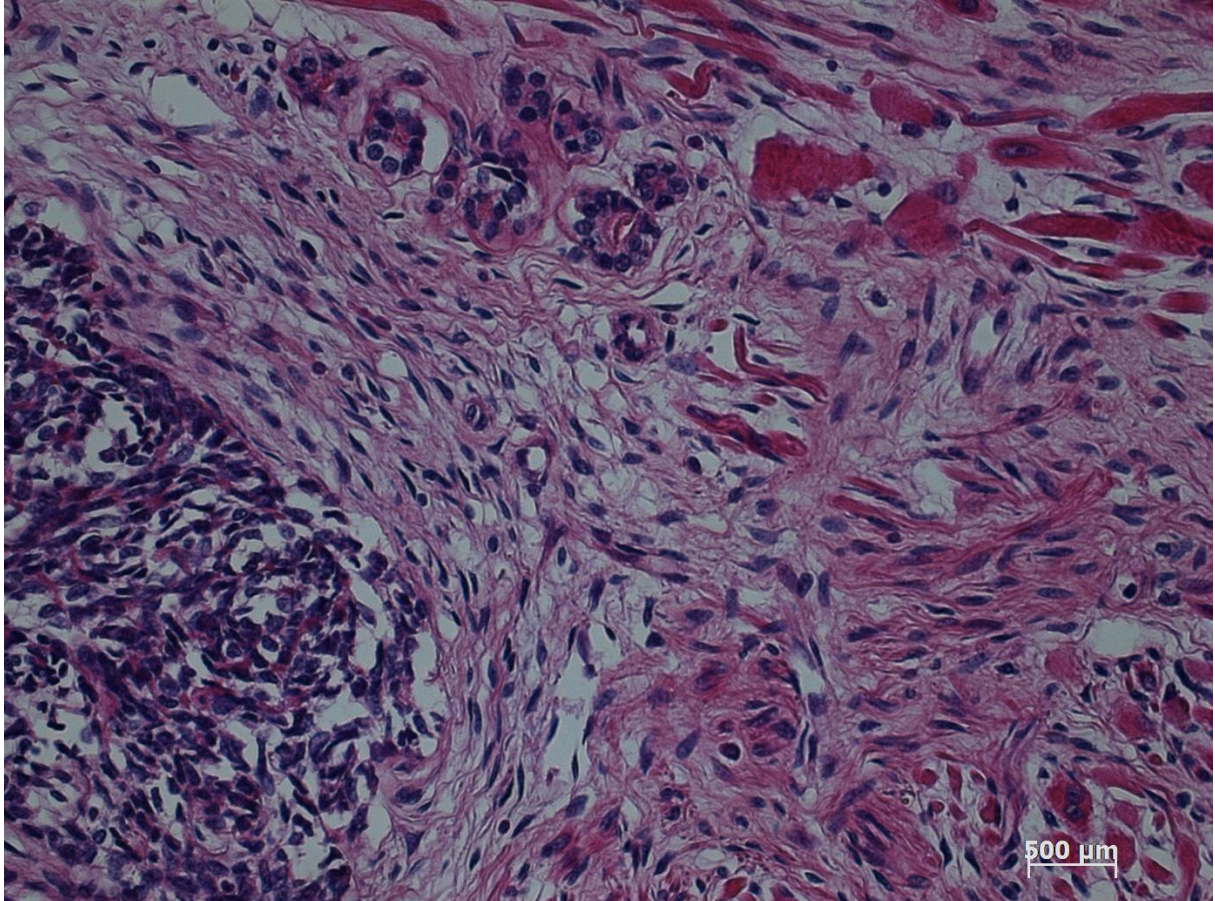
1.5.2 MICROSCOPIA

Um único nefroblastoma pode expressar todo o espectro de diferenciação nefrogênica, do blastema primitivo a células epiteliais e estromais semelhantes ao rim maduro (BECKWITH, 1998). Os nefroblastomas são caracterizados histologicamente por proporções variadas de blastema, epitélio e estroma em graus diversos de diferenciação, originando uma plêiade de tumores com aparência histológica distinta (VUJANIĆ, 2009).

Os nefroblastomas em geral são trifásicos, compostos por uma mistura de células do blastema e elementos diferenciados como epitélio e estroma (FIGURA 2). Variantes monofásicas ou bifásicas não são incomuns (BRESLOW; BECKWITH, 1982; BECKWITH, 1983; SCHUMACHER *et al.*, 2003). A quimioterapia pré-cirúrgica

pode interferir na histologia original reduzindo ou aumentando certos tipos histológicos ou induzindo a maturação celular (VUJANIĆ, 2009; SEBIRE; VUJANIĆ, 2009).

FIGURA 2 – HISTOLOGIA DO NEFROBLASTOMA



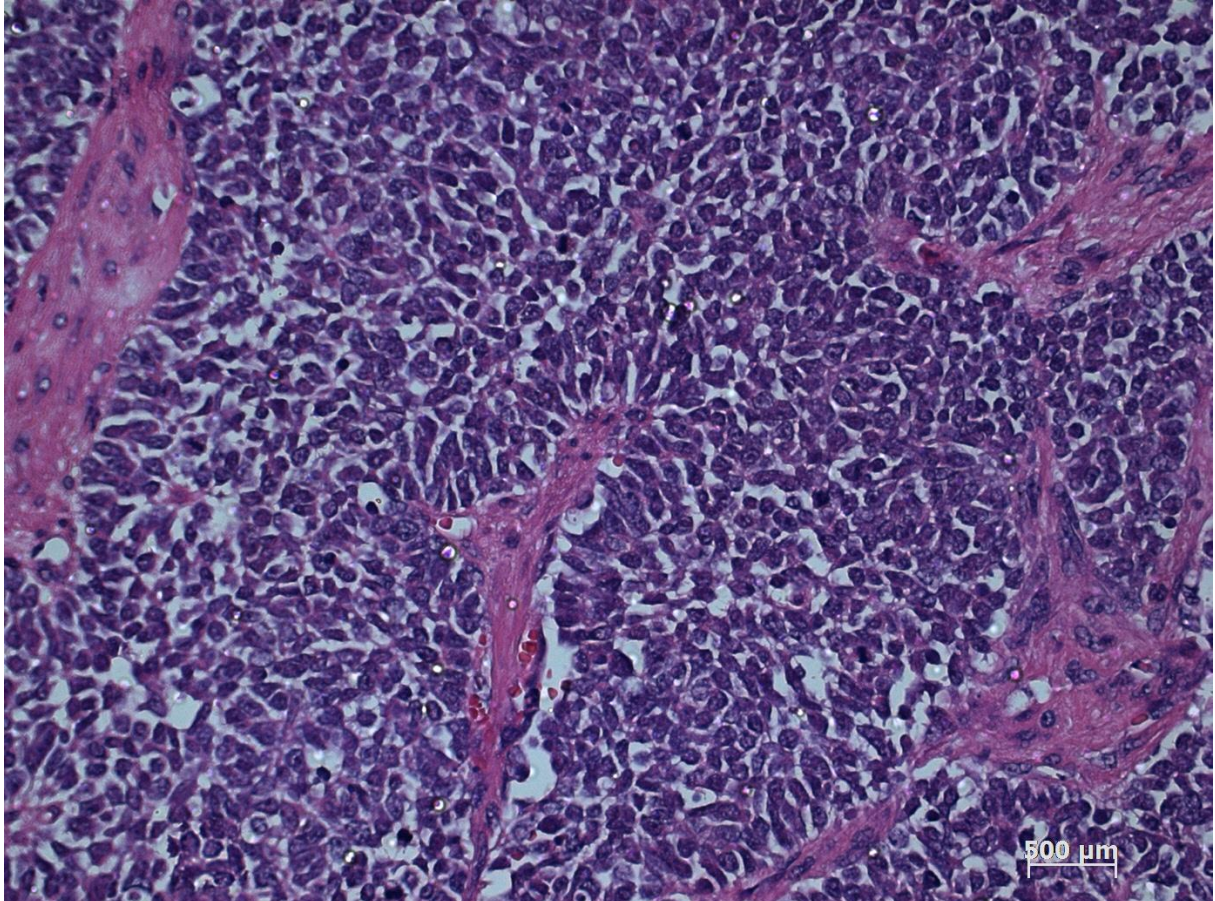
Legenda: Nefroblastoma tipo histológico trifásico. Observam-se estruturas tubulares epiteliais circundadas por blastema e estroma rabdomioblástico (400x, HE).

FONTE: o autor (2016).

As células que compõem o blastema são pequenas, variam de ovais a redondas e apresentam citoplasma escasso (FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005). Os padrões histológicos de nefroblastoma incluem o difuso, serpentiginoso, nodular e basalóide. Estruturas tubulares primitivas podem estar imersas em nódulos de blastema mimetizando morfologicamente áreas neuroblastoma símile com pseudorosetas. O blastema pode esboçar padrão fusocelular ou epitelióide dependendo da extensão e padrão da diferenciação (VADEN HEUVEL-EIBRINK, 2016). Nefroblastomas monofásicos com predomínio do componente blastematoso costumam ser invasivos, são diagnosticados em estádios mais avançados e seu aspecto histológico dificulta o diagnóstico diferencial com

outros tumores de células pequenas azuis e redondas, como tumor primitivo neuroectodérmico, neuroblastoma e linfoma (FIGURA 3) (KALAPURAKAL *et al.*, 2004).

FIGURA 3 – COMPONENTE BLASTEMATOSO DE NEFROBLASTOMA

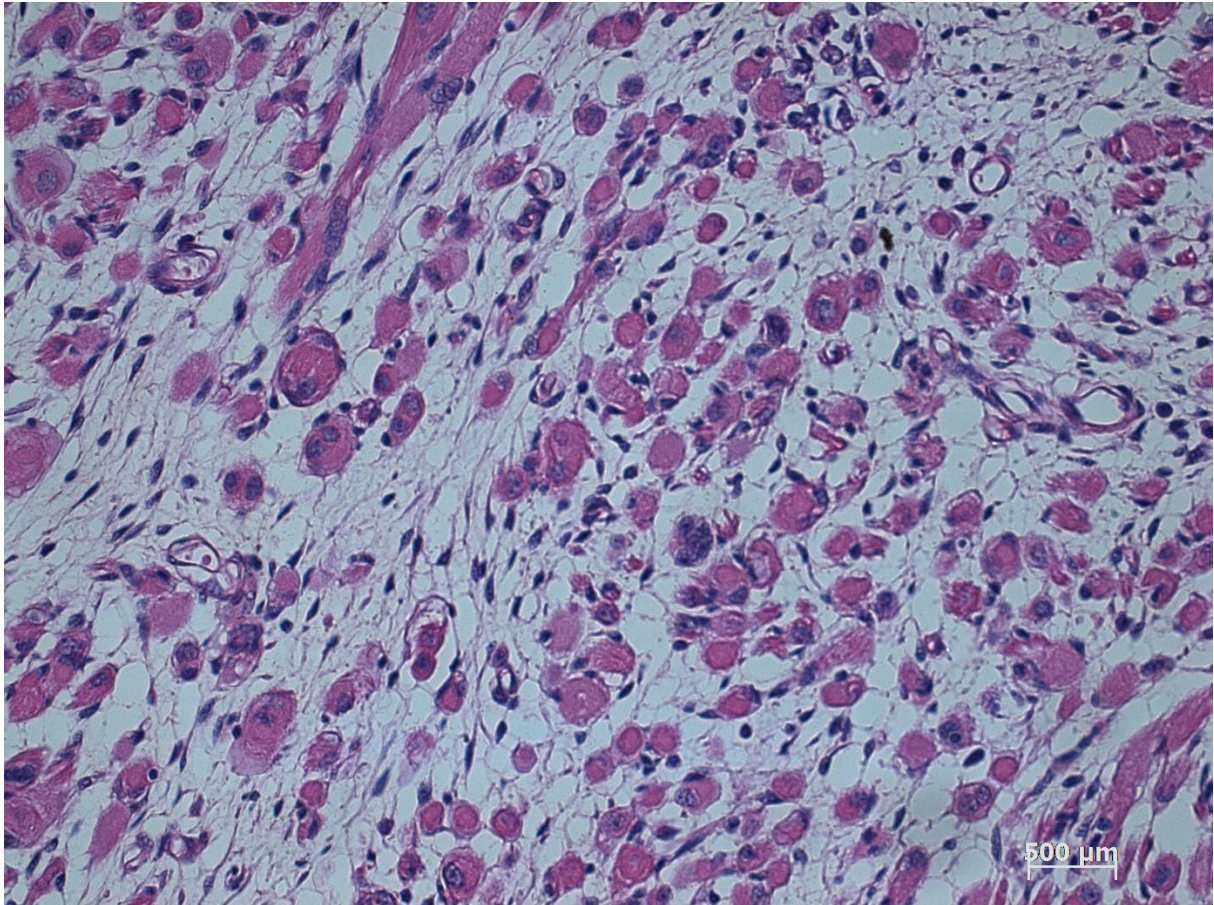


Legenda: Nefroblastoma predominantemente blastematoso. Blastema composto por células pequenas com citoplasma escasso e eventual sobreposição nuclear com arranjo sólido (400x, HE).

FONTE: o autor (2016).

O componente estromal é formado por células semelhantes a fibroblastos e pode apresentar áreas mixóides, fusocelulares, células musculares esqueléticas, musculares lisas ou elementos neurais (LEMERLE *et al.*, 1976; FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005). Componentes heterólogos como músculo liso, cartilagem, osso e tecido adiposo podem ser encontrados em aproximadamente 10% dos casos (FIGURA 4) (SCHUMACHER *et al.*, 2003). Áreas mixóides podem ser confundidas com alterações induzidas pela quimioterapia (VA DEN HEUVEL-EIBRINK, 2016).

FIGURA 4 – DIFERENCIAÇÃO RABDOMIOBLÁSTICA DO COMPONENTE ESTROMAL DO NEFROBLASTOMA



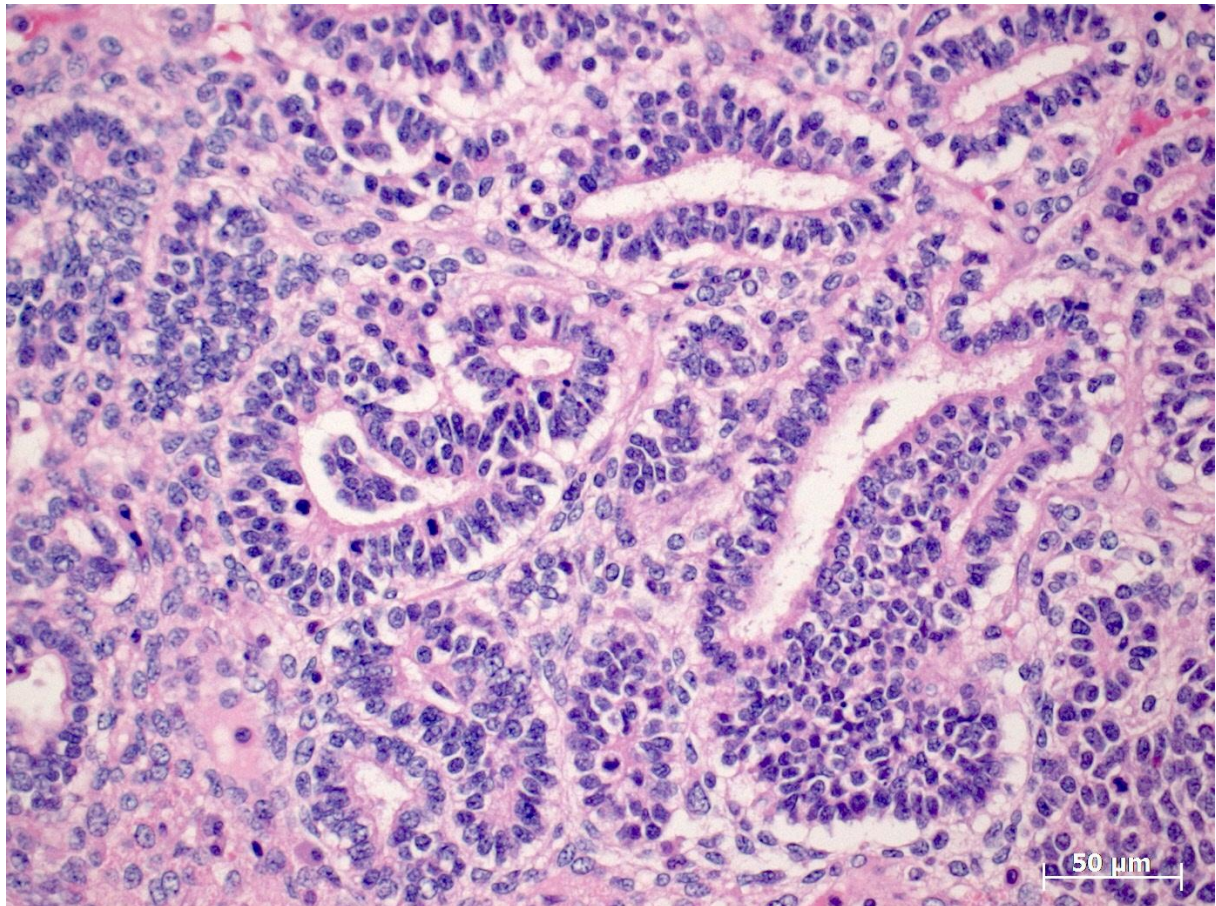
Legenda: Estroma do nefroblastoma apresentando diferenciação muscular estriada esquelética (400x, HE).
FONTE: o autor (2016).

O componente epitelial pode apresentar um espectro de estruturas que recapitulam a nefrogênese, como estruturas epiteliais primitivas semelhantes a rosetas, túbulos, estruturas com arranjo glandular pouco definido e estruturas glomerulares ao redor de pequenas alças capilares (FIGURA 5) (LEMERLE *et al.*, 1976; FUKUZAWA *et al.*, 2004; RIVERA; HABER, 2005; VA DEN HEUVEL-EIBRINK, 2016).

A anaplasia é talvez a principal característica relacionada a prognóstico adverso em nefroblastomas (DOME *et al.*, 2006). Em estudo dirigido pelo *National Wilms Tumor Study*, Beckwith e Palmer (1978) observaram a associação de anaplasia em nefroblastomas com pior prognóstico. Estes autores sugeriram a classificação dos tumores em histologia desfavorável e favorável, se anaplasia presente ou ausente, respectivamente, e definiram anaplasia em nefroblastomas através de três características histológicas: presença de mitoses atípicas

hiperdiploides, aumento nuclear de pelo menos três vezes o tamanho dos núcleos de células adjacentes do mesmo tipo e marcada hipercromasia (FIGURA 6) (BECKWITH; PALMER, 1978). A anaplasia pode ser classificada como focal ou difusa (FARIA *et al.*, 1996). A anaplasia pode ocorrer em qualquer tipo celular, no entanto é rara no componente estromal (VUJANIĆ, 2009). A anaplasia, presente em 5 a 10,1% dos nefroblastomas, é um marcador de resistência a quimioterapia, associada à disseminação regional, óbito e recaídas (BONADIO *et al.*, 1985; BECKWITH *et al.*, 1996; FARIA *et al.*, 1996; VUJANIĆ *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*; 2004; DOME *et al.*, 2006).

FIGURA 5 – COMPONENTE EPITELIAL DO NEFROBLASTOMA

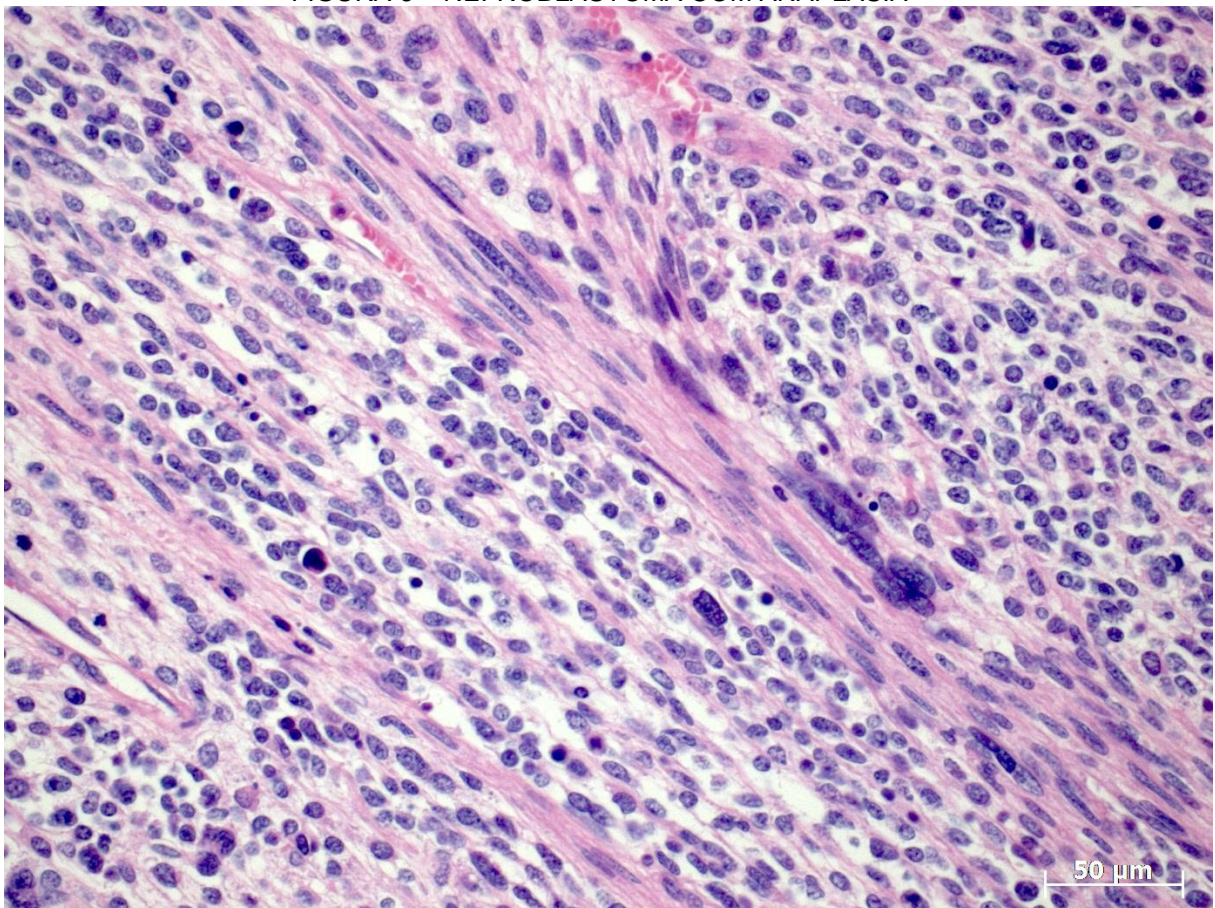


Legenda: Nefroblastoma com áreas epiteliais demonstrando estruturas tubulares com luzes bem formadas imersas em estroma (400x, HE).
FONTE: o autor (2017).

Nefroblastomas com anaplasia difusa estão relacionados ao pior prognóstico, principalmente nos estádios II-IV (BECKWITH *et al.*, 1996). No entanto, a anaplasia focal apresenta resultados controversos na literatura. Alguns estudos correlacionam a anaplasia focal a um prognóstico semelhante àquele dos tumores sem anaplasia, enquanto outros estudos não confirmam tal fato (FARIAS *et al.*, 1996; WEIRICH *et*

al.; 2004; DOME *et al.*, 2006). No *National Wilms Tumor Study- 5*, nefroblastomas unilaterais com anaplasia correspondiam a 18,6% dos tumores submetidos à quimioterapia pré-cirúrgica e a 8,7% dos tumores submetidos à nefrectomia inicial, sem diferenças na evolução clínica entre os dois grupos (DOME *et al.*, 2006). Mutações do TP53 foram encontradas em 55% dos nefroblastomas com anaplasia difusa, contudo estudos que correlacionam a presença destas mutações com o prognóstico neste grupo de pacientes estão em andamento (MASCHIETTO *et al.*, 2014). Amplificações no MYCN também têm sido relatadas em associação a anaplasia (WILLIAMS, *et al.*, 2015).

FIGURA 6 – NEFROBLASTOMA COM ANAPLASIA



Legenda: Nefroblastoma anaplásico caracterizado pela presença de núcleos grandes e hiper cromáticos (400x, HE).

FONTE: o autor (2017).

1.6 SEQUELAS DO TRATAMENTO

Embora o tratamento do nefroblastoma atinja taxas de sobrevida excelentes, os sobreviventes apresentam uma incidência cumulativa de doenças crônicas de

65% após 25 anos do diagnóstico de nefroblastoma (COTTON *et al.*, 2009). O tratamento radioterápico e quimioterápico a que são submetidos os pacientes com nefroblastoma podem causar efeitos secundários a outros órgãos, bem como segunda neoplasia (GREEN *et al.*, 1996).

Em um estudo conduzido pelo *National Wilms Tumor Study* entre 1969 e 1995, a maioria dos óbitos em pacientes com menos de cinco anos de seguimento foram decorrentes da progressão da doença ou de efeitos agudos do tratamento (COTTON *et al.*, 2009).

Pacientes após tratamento de nefroblastoma podem evoluir com insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal, hipertensão e síndrome metabólica (TERMUHLEN *et al.*, 2011; VAN WAAS *et al.*, 2012).

A cardiotoxicidade é efeito conhecido dos antracíclicos. Os antracíclicos são cardiotóxicos com potencial dano ao cardiomiócito resultando na progressão de casos assintomáticos para insuficiência cardíaca e arritmias. Nos estudos *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 09/GPOH* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 93-01/GPOH* 2,5% dos pacientes apresentavam redução da contratilidade do ventrículo esquerdo e 5,6% alterações eletrocardiográficas 2,9 anos após o termino da terapia (MARX *et al.*, 2002).

As complicações da radioterapia incluem escoliose, assimetria, atrofia e alterações endócrinas (CAPRA *et al.*, 1999; WEIRICH *et al.*, 2004). Hipoplasia mamária ocorre em pacientes submetidas à radioterapia torácica por metástases pulmonares (EHRlich *et al.*, 2006).

Entre os efeitos colaterais secundários a quimioterapia e a radioterapia, o mais grave é a segunda neoplasia. Observa-se risco aumentado para o desenvolvimento de segundas neoplasias sólidas e leucemias relacionadas respectivamente ao campo irradiado, à dose do tratamento radioterápico e a quimioterapia com agentes alquilantes e epipodofilotoxinas (BRESLOW *et al.*, 1995; SHEARER *et al.*, 2001; TAYLOR *et al.*, 2008; NOURKAMI *et al.*, 2009).

São descritos sarcomas, carcinomas mamários, adenocarcinomas, melanomas, neoplasias de tireoide, leucemia linfóide e meduloblastoma como segunda neoplasia em pacientes com nefroblastoma (TERMUHLEN *et al.*, 2011). Carcinomas mamários invasores podem ser encontrados em aproximadamente 15% das pacientes do sexo feminino que receberam radioterapia para o tratamento do nefroblastoma (LANGE *et al.*, 2014).

Os pacientes com nefroblastoma têm sobrevida superior quando comparados a outras neoplasias da infância, mas o risco de óbito em decorrência de efeitos tardios, permanece elevado 20 anos após o diagnóstico (COTTON *et al.*, 2009).

1.7 RECORRÊNCIA TUMORAL

Pacientes com recidiva de nefroblastoma apresentavam historicamente taxa de sobrevida de 25%. A intensificação do tratamento melhorou este panorama. Estudos colaborativos entre SIOP e NWTS permitiram dividir os pacientes em grupos de risco após a terapia de salvamento (DOME *et al.*, 2015). As recorrências de nefroblastomas podem ser incluídas em três categorias: risco padrão, alto risco e muito alto risco. O risco padrão ou *standart* é definido por pacientes com histologia favorável que recidivaram após terapia com apenas duas drogas. Alto risco são pacientes com risco intermediário que recidivaram após terapia com três ou mais agentes. Muito alto risco são as recidivas em pacientes com nefroblastomas anaplásicos ou blastematosos (SPREAFICO *et al.*, 2009). Recorrências tardias são raras ocorrendo em aproximadamente 0,5% dos pacientes (MALOGOLOWKIN *et al.*, 2013).

As recorrências em tumores com histologia favorável estão relacionadas à invasão tumoral e a resposta da doença residual a terapia (HUANG *et al.*, 2009; MESSAHEL *et al.*, 2009).

Segundo dados da literatura, pacientes com recidivas são mais velhos, têm estágio clínico mais avançado, maior proporção de metástases à distância e tumores de alto risco (BRESLOW *et al.*, 1985; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; REINHARD *et al.*, 2008). A correlação entre sexo, etnia e recorrências não foi comprovada estatisticamente (BRESLOW *et al.*, 1978).

A compreensão do risco de recidiva tumoral permite a formulação de recomendações para o seguimento dos pacientes (MALOGOLOWKIN *et al.*, 2013).

1.8 FATORES PROGNÓSTICOS

Diversas características clínico-patológicas foram estudadas com o objetivo de identificar variáveis de importância prognóstica e terapêutica permitindo a estratificação dos pacientes em grupos de risco.

Entre as inúmeras variáveis clínico-patológicas estudadas idade, grupo de risco, estadiamento, histologia, peso tumoral, invasão vascular e metástases foram relatados como importantes fatores prognósticos (BRESLOW *et al.*, 1978; WEIRICH *et al.*, 2001). Atualmente os principais fatores prognósticos são estadiamento, subtipo histológico e perda da heterozigose do 1p/16q (GRUNDY *et al.*, 2005; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK *et al.*, 2015; BECKWITH; PALMER, 1978).

1. 8. 1 IDADE

Os estudos conduzidos em especial pelo SIOP e NWTS têm demonstrado a relação entre o prognóstico e a idade ao diagnóstico em pacientes com nefroblastoma. Observou-se no *National Wilms Tumor Study- 1* que pacientes com idade inferior a 2 anos tinham menor número de recidivas, principalmente a distância (BRESLOW *et al.*, 1978). Enquanto no *National Wilms Tumor Study- 2*, os resultados indicaram que o pior prognóstico em pacientes com mais de 2 anos refletia a associação com outras variáveis de pior prognóstico, como invasão da veia renal, disseminação abdominal, rotura tumoral e histologia desfavorável (BRESLOW *et al.*, 1985). A análise dos dados do *National Wilms Tumor Study- 3* mostrou correlação entre idade superior a 2 anos e recorrência e óbito pela neoplasia (BRESLOW *et al.*, 1991).

O melhor prognóstico em pacientes menores de 2 anos está associado a presença de outras variáveis que predizem melhor prognóstico como histologia favorável e extensão da doença (BRESLOW *et al.*, 1978; BRESLOW *et al.*, 1985).

No estudo subsequente, *National Wilms Tumor Study- 4*, pacientes com idade inferior a 2 anos e peso tumoral inferior a 550g apresentaram diagnóstico favorável pela ausência de variáveis de microestadiamento. A partir destes achados, sugeriu-se que apenas a nefrectomia seria o suficiente para tratar este grupo de pacientes (GREEN *et al.*, 1994). Porém, no *National Wilms Tumor Study- 5* este grupo denominado de muito baixo risco, com estágio I, histologia favorável, idade inferior a 2 anos e peso tumoral inferior a 550g, após tratamento exclusivo com nefrectomia, recorreram em aproximadamente 10% dos casos (GREEN *et al.*, 2001). Inicialmente este protocolo de pesquisa foi fechado, mas com as taxas de sucesso obtidas com as terapias de resgate, os novos protocolos incluem como opção o tratamento cirúrgico exclusivo para os pacientes de muito baixo risco (SREDNI *et al.*, 2009).

Resultados semelhantes foram obtidos pelos grupos europeus que seguiram o protocolo da *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*- 9. Pacientes com idade inferior a 2 anos, tumores pequenos e estágio I evoluíram com melhor prognóstico (PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; WEIRICH *et al.*, 2004).

1. 8. 2 GRUPO DE RISCO

O diagnóstico histológico correto em espécimes cirúrgicos suspeitos de nefroblastoma é imprescindível (DE KRAKER *et al.*, 1999). Além da avaliação dos componentes histológicos e extensão da neoplasia, o patologista diante de um caso de nefroblastoma deve estar atento para as alterações secundárias à quimioterapia. Os dois grandes grupos de estudos em nefroblastoma, NWTS e SIOP, baseiam-se em critérios diagnósticos diferentes para a classificação dos nefroblastomas, pois preconizam abordagens terapêuticas distintas. Os resultados dos estudos dirigidos pela SIOP em tumores com alterações secundárias a quimioterapia pré-cirúrgica permitiram a subclassificação destes tumores em três grupos de risco: baixo risco, risco intermediário e alto risco como detalhado nos QUADROS 2 e 3 (VUJANIĆ *et al.*, 2002; VUJANIĆ *et al.*, 2009). A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique Working Classification of Renal Tumors*, revisada em 2001, é a classificação atual da SIOP, utilizada pelo grupo brasileiro, e enfatiza a classificação em grupos de risco de acordo com o subtipo histológico (BOCCON-GIBOD *et al.*, 2000; VUJANIĆ *et al.*, 2009). Ao efetuar a análise histológica dos espécimes, deve-se atentar à proporção de necrose e/ou alterações regressivas causadas pela quimioterapia. Se ao avaliar um espécime, áreas de necrose e/ou alterações regressivas correspondam à totalidade do tumor, confirmada após minuciosa avaliação macro e microscópica de diferentes áreas do tumor, este deve receber o nome de nefroblastoma completamente necrótico. Nos casos em que as alterações regressivas perfazem mais de 2/3 da massa tumoral, o tumor deve ser denominado do tipo regressivo. Os tumores com pelo menos um terço de sua massa tumoral viável são subclassificados com base no componente viável (VUJANIĆ *et al.*, 2002).

QUADRO 2 – SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE WORKING
CLASSIFICATION OF RENAL TUMORS

I. TUMORES DE BAIXO RISCO
Nefroma mesoblástico
Nefroblastoma diferenciado parcialmente cístico
Nefroblastoma completamente necrótico
II. TUMORES DE RISCO INTERMEDIÁRIO
Nefroblastoma tipo epitelial
Nefroblastoma tipo estromal
Nefroblastoma tipo misto
Nefroblastoma tipo regressivo
Nefroblastoma tipo anaplasia focal
III. TUMORES DE ALTO RISCO
Nefroblastoma tipo blastematoso
Nefroblastoma tipo anaplasia difusa
Sarcoma de células claras renal
Tumor rabdóide renal

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

QUADRO 3 – CRITÉRIOS HISTOLÓGICOS PARA SUBCLASSIFICAR NEFROBLASTOMAS
SEGUNDO SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE 2001

Tipo do tumor	Achados histológicos (% do tumor)			
	AIQ	Epitélio	Estroma	Blastema
Completamente necrótico	100%	0	0	0
Regressivo	> 66%	0 – 33%	0 – 33%	0 – 33%
Misto	< 66%	0 – 65%	0 – 65%	0 – 65%
Epitelial	< 66%	66 – 100%	0 – 33%	0 – 10%
Estromal	< 66%	0 – 33%	66 – 100%	0 – 10%
Blastematoso	< 66%	0 – 33%	0 – 33%	66 – 100%

NOTA: AIQ – alterações induzidas pela quimioterapia.

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

O nefroblastoma tipo blastematoso é considerado como de alto risco, quando diagnosticado após quimioterapia, pois apresenta pior prognóstico quando comparado aos demais subtipos de risco intermediário e este grupo de pacientes se beneficiam de terapia pós-cirúrgica mais intensa (VUJANIĆ *et al.*, 2002; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK *et al.*, 2015).

O emprego da quimioterapia pré-cirúrgica em nefroblastomas estimulou a investigação das alterações sofridas pelo tumor em decorrência do efeito quimioterápico. Comparando-se a proporção de blastema em biópsias pré-cirúrgicas e em espécimes cirúrgicos, observou-se a redução de nódulos blastematosos, que sofrem necrose ou maturação, frequentemente para estruturas rabdomiomatosas. A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique 9/GPOH* demonstrou que a quimioterapia pré-cirúrgica destrói o componente blastematoso e a resposta do blastema a quimioterapia está claramente associada à recorrência (BOCCON-GIBOD, 1998; BOCCON-GIBOD *et al.*, 2000). O crescente número de tumores do tipo estromal quando comparados aos tumores provenientes de nefrectomia inicial,

sugerem que a quimioterapia pré-cirúrgica induza alterações de maturação como as observadas no rabdomiossarcoma. Além disso, houve uma redução no número de tumores mistos, sugerindo que muitos destes tumores tenham se tornado tumores com predomínio estromal (WEIRICH *et al.*, 2001).

Além dos nefroblastomas tipo blastematoso e com anaplasia difusa, pertencem ao grupo de tumores de alto risco o sarcoma de células claras e tumor rabdoide, correspondendo a 4% e 2% dos tumores renais em crianças, respectivamente (VUJANIĆ *et al.*, 2002).

1. 8. 3 ESTADIAMENTO

O principal fator prognóstico em nefroblastomas é o estadiamento patológico, clínico e cirúrgico, que orienta o tratamento indicando quais pacientes devem receber tratamento intensificado. Estádios iniciais com doença localizada (estádios I e II) têm melhor prognóstico quando comparados a estádios avançados (estádios III e IV). O estadiamento é definido principalmente pelos seguintes fatores:

(1) Linfonodos: A dissecação de linfonodos regionais e hilares são importantes para o estadiamento (KALAPURAKAL *et al.*, 2004). O comprometimento de linfonodos está associado ao estágio da doença, à extensão local do tumor e ao pior prognóstico (JEREB *et al.*, 1980). Metástases para linfonodos estão associadas a maiores taxas de metástases à distância e de mortalidade pela neoplasia (BRESLOW *et al.*, 1985). Parece que linfonodos positivos e êmbolos neoplásicos intrarrenais correlacionam-se a micrometástases, fato reforçado pela associação com metástases pulmonares (BRESLOW *et al.*, 1991). Pacientes não submetidos à biópsia de linfonodos no *National Wilms Tumor Study- 4* apresentaram maior recorrência abdominal (SHAMBERGER *et al.*, 1999). A não ressecção de linfonodos locais está associada ao aumento no risco de recorrência local e subestadiamento (HONEYMAN *et al.*; 2012).

(2) Disseminação peritoneal: a ruptura tumoral e disseminação peritoneal alteram as taxas de sobrevida e aumentam a probabilidade de disseminação e recorrência abdominal (SHAMBERGER *et al.*, 1999; GREEN *et al.*, 2014). A *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* divulga como um dos principais benefícios da quimioterapia pré-cirúrgica a redução do risco de ruptura tumoral durante a cirurgia (CAPRA *et al.*, 1999; KALAPURAKAL *et al.*, 2010). Como resultado da disseminação

de células neoplásicas após ruptura tumoral em pacientes estágio II e histologia favorável do *National Wilms Tumor Study- 4*, houve redução da sobrevida global e 7,3% dos pacientes desenvolveram recorrência abdominal da doença (KALAPURAKAL *et al.*, 2010).

(3) Invasão vascular: trombo tumoral na veia cava inferior ou porção extrarenal da veia renal estava correlacionada ao aumento da taxa de metástases a distância no *National Wilms Tumor Study- 2* (BRESLOW *et al.*, 1985).

(4) Metástases: A doença metastática (estádio IV) é importante fator de pior prognóstico com sobrevida livre de evento em 5 anos de 75% para nefroblastomas com histologia favorável (GREEN *et al.*, 1996; EHRLICH *et al.*, 2009). O nefroblastoma pode recorrer em locais como pulmões, fígado, rim contra-lateral e leito tumoral (GREEN *et al.*, 1996). As metástases são mais comuns para pulmões (40,5-44%), mas outros órgãos como fígado (2,12-10,7%), cérebro (1,2%) e ossos (2%) também podem ser comprometidos (LEMERLE *et al.*, 1976; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2003; SZAVAY *et al.*, 2006). A ocorrência de metástases é mais comum em pacientes mais velhos e em tumores volumosos (BRESLOW *et al.*, 1986). Alguns indicadores estão relacionados à presença de metástases, como o comprometimento de linfonodos, a extensão regional da neoplasia e a presença de anaplasia à histologia (BRESLOW *et al.*, 1986; EHRLICH *et al.*, 2009). Aproximadamente 30% dos pacientes com metástases linfonodais têm metástases ao diagnóstico e 20% desenvolvem metástases durante o tratamento quimioterápico (BRESLOW *et al.*, 1986). Em tumores com extensão tumoral para vasos renais o risco aproximado para desenvolvimento de metástases é de 50% (BRESLOW *et al.*, 1986). Não há diferença quanto ao prognóstico entre metástases pulmonares e hepáticas nos estudos conduzidos pelo *National Wilms Tumor Study* e *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (BRESLOW *et al.*, 1986; EHRLICH *et al.*, 2009). Porém Varan *et al.* (2005) observaram sobrevida global em pacientes com metástases pulmonares de 50,2% e em pacientes com metástases hepáticas de 16,6%. Atualmente, não há consenso quanto ao tratamento e abordagem de doença metastática, tanto para metástases pulmonares quanto para hepáticas. Um dos objetivos dos grupos cooperativos é estabelecer a melhor abordagem para estes casos, buscando a estratificação dos pacientes (NICOLIN *et al.*, 2008).

O estadiamento empregado pela SIOP e pelo NWTS está detalhado no QUADRO 4.

QUADRO 4 – ESTADIAMENTO SEGUNDO A SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE E A NATIONAL WILMS TUMOR STUDY

Estádio	NATIONAL WILMS TUMOR STUDY	SOCIÉTÉ INTERNATIONALE D'ONCOLOGIE PÉDIATRIQUE
I	Tumor limitado ao rim e completamente extirpado; superfície da cápsula renal intacta. O seio renal não pode estar envolvido	Tumor limitado ao rim e completamente extirpado; superfície da cápsula renal intacta. O seio renal não está envolvido
II	Tumor estende-se além do rim, mas foi completamente extirpado (margens negativas). Existe extensão regional do tumor: penetração nos tecidos perirenais através da cápsula renal. Vasos fora do rim podem estar soltos, totalmente retirados. Pode ter sido biopsiado e ocorrido rotura localizada no flanco. Nenhum linfonodo pode estar comprometido.	Tumor estende-se além do rim, mas foi completamente extirpado (margens negativas). Existe extensão regional do tumor: penetração nos tecidos perirenais através da cápsula renal. Vasos fora do rim podem estar infiltrados ou conter trombos soltos e totalmente retirados.
III	Tumor residual confinado ao abdome. Um dos seguintes itens pode ocorrer: <ul style="list-style-type: none"> • linfonodos comprometidos no hilo, cadeias peri-aórticas ou outros; • contaminação peritoneal por rotura tumoral; • implantes peritoneais; • vasos com embolo do tumor aderente à íntima e não totalmente ressecados; • tumor não completamente ressecado; • biópsia prévia com contaminação peritoneal. 	Tumor residual confinado ao abdome, complicado por um dos seguintes itens: <ul style="list-style-type: none"> • tumor biopsiado; • rotura durante ou após a cirurgia; • metástases peritoneais; • comprometimento de linfonodos; • ressecção incompleta; • contaminação peritoneal por rotura tumoral; • implantes peritoneais; • presença de alterações necróticas induzidas pela quimioterapia em linfonodos ou nas margens de ressecção.
IV	Metástases hematogênicas (pulmão, fígado, osso, cérebro), ou metástases para linfonodos fora da região abdominal e pélvica	Metástases hematogênicas (pulmão, fígado, osso, cérebro), ou metástases para linfonodos fora da região abdominal e pélvica
V	Envolvimento bilateral	Envolvimento bilateral

FONTE: BOCCON-GIBOD *et al.* (2000).

A divisão em estádios é baseada em critérios multidisciplinares e orienta o tratamento pós-operatório. Conseqüentemente, o correto estadiamento é imprescindível para conduta terapêutica adequada (DE KRAKER *et al.*, 1999).

1. 8. 4 ASPECTOS HISTOLÓGICOS RELEVANTES PARA O PROGNÓSTICO

O aspecto histológico dos nefroblastomas corresponde a um dos principais fatores prognósticos. A anaplasia está associada ao pior prognóstico (BECKWITH *et al.*, 1996). Após a nova classificação da anaplasia em difusa e focal, comprovou-se que apenas a anaplasia difusa estava associada a pior prognóstico (BECKWITH *et al.*, 1996). No *National Wilms Tumor Study- 5*, para tumores de histologia

desfavorável, a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global em 4 anos foram de 69,5% e 82,6%, respectivamente (DOME *et al.*, 2006).

1. 8. 5 PESO TUMORAL

O peso, assim como a idade, é considerado fator prognóstico de interesse em nefroblastomas. Esta foi uma das variáveis utilizadas por Cassady *et al.* para definir o estágio I em seu sistema de estadiamento. Estes autores definiram como estágio I tumores com peso inferior a 550g (CASSADY *et al.*, 1973). Baseados no excelente prognóstico obtido em pacientes que preenchiam os critérios definidos por Cassady *et al.*, com peso inferior a 550g e idade inferior a 24 meses, o tratamento cirúrgico passou a ser sugerido como abordagem terapêutica isolada para este grupo de pacientes (LARSEN *et al.*, 1990).

Segundo os resultados do *National Wilms Tumor Study- 1*, pacientes com tumores de peso inferior a 250g apresentaram menores taxas de óbito e recaídas abdominais (BRESLOW *et al.*, 1978). Já no *National Wilms Tumor Study- 2* os resultados não corroboraram o efeito do peso tumoral sobre o prognóstico (BRESLOW *et al.*, 1985). O peso tumoral voltou a se correlacionar com as taxas de óbito e recaída no *National Wilms Tumor Study- 3* (BRESLOW *et al.*, 1991). Ao estudar pacientes no estágio I e histologia favorável o *National Wilms Tumor Study Group* observou que tumores com peso inferior a 550g estavam associados à ausência de variáveis de prognóstico desfavorável, como pseudocápsula inflamatória, invasão do seio renal, invasão da cápsula e invasão de vasos intrarrenais (WEEKS; BECKWITH; LUCKEY, 1987).

1. 8. 6 VARIÁVEIS DE MICROESTADIAMENTO

Weeks, Beckwith e Luckey (1987) avaliaram a presença de invasão capsular, pseudocápsula inflamatória, invasão do hilo renal e invasão de vasos intrarrenais em nefroblastomas estágio I e histologia favorável e denominaram este conjunto de aspectos histopatológicos com significado prognóstico de microestadiamento. No *National Wilms Tumor Study- 3* todos os casos de recorrência tumoral apresentavam ao menos um dos fatores de microestadiamento (WEEKS; BECKWITH; LUCKEY, 1987).

Pacientes estágio I com idade inferior a 2 anos têm menor probabilidade de exibirem variáveis de microestadiamento segundo o *National Wilms Tumor Study- 4* (GREEN *et al.*, 1994).

1.9 A IMUNOHISTOQUÍMICA

As últimas décadas testemunharam o progresso da genômica que afetou diretamente a prática da patologia. Novas tecnologias aplicadas à patologia como a imunoistoquímica, a produção de anticorpos monoclonais, recuperação antigênica e análise de imagens, levaram a rotina da patologia a outro patamar. A melhor compreensão das bases moleculares dos tumores impulsionaram a medicina de precisão e a medicina personalizada (GU; TAYLOR; PHIL, 2014). Esta última baseia-se na avaliação individual das alterações moleculares através de metodologias seguras, eficazes, ágeis e pouco dispendiosas que possam ser instituídas na prática médica diária (DUNSTAN *et al.*, 2011).

A crescente demanda por subclassificações moleculares de tumores, fatores prognósticos, marcadores de resposta terapêutica e novos alvos terapêuticos, foi suprida pela patologia molecular e requer uma série de métodos investigativos, tais como a reação em cadeia de polimerase, sequenciamento de DNA e RNA, hibridização fluorescente *in situ* e arranjos gênicos, desenvolvidas com base na evolução do conhecimento das aberrações gênicas (MÜLLAUER, 2017).

Entre as técnicas empregadas em patologia destaca-se a imunoistoquímica utilizada em pesquisa e como técnica complementar no diagnóstico diferencial em anatomia patológica. A imunoistoquímica contribui para a subtipagem de neoplasias, caracterização de sítio primário, pesquisa de fatores prognósticos e alvos terapêuticos e determinação de comportamento biológico de neoplasias (LEONG; WRIGHT, 1987; JAFFER; BLEIWEISS, 2004). A imunoistoquímica é utilizada para a pesquisa de antígenos celulares ou teciduais que podem variar desde biomarcadores proteicos *in situ* para a diferenciação tecidual, a identificação de microrganismos e alvos terapêuticos específicos para o tratamento do câncer (CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2015). A imunoistoquímica é considerada por alguns autores como uma forma de identificação da origem celular e de reconhecimento das funções celulares *in vivo* (BRADTZAEG, 1998). As biomoléculas teciduais avaliadas à imunoistoquímica fornecem informações espaciais e contextuais e estão

próximas ao local de ação. Os tecidos possuem diversos tipos celulares em estados funcionais diferentes como fonte potencial de informações (CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2015).

Atualmente entre as principais funções da imunoistoquímica esta a avaliação de biomarcadores. A definição abrangente de biomarcadores inclui qualquer porção biológica ou fisiológica que pode ser utilizada para definição de doenças, orientação terapêutica ou monitoramento de recorrência (STRIMBU; TAVEL, 2010). Biomarcadores são definidos pelo *Biomarkers Definitions Working Group* (2001) como características objetivamente mensuráveis ou avaliáveis como potenciais indicadores de um processo biológico, patogênico ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Podem contribuir para o diagnóstico efetivo e eficiente de neoplasias, definir fatores prognósticos, predizer melhor opção terapêutica e reconhecer possível efeito tóxico ao paciente (DUNSTAN *et al.*, 2011).

A imunoistoquímica tem como principal papel a avaliação binária (presente ou ausente) contextual do biomarcador. No entanto, tais biomarcadores podem ser mensurados e descritos quanto à localização nos compartimentos subcelulares. A quantificação da expressão proteica *in situ* tem sido proposta em especial quando associada à terapia alvo (CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2015).

Ao longo das últimas décadas houve o surgimento de equipamentos de melhor definição para a análise quantitativa do sinal imunoistoquímico. Estes equipamentos utilizam a segmentação da imagem e algoritmos de quantificação para a mensuração do sinal em uma área selecionada ou célula. A análise de imagens digitais permite a avaliação de alterações na intensidade e distribuição que podem ser imperceptíveis ao olho humano (TAYLOR, 2014).

O emprego de cromógenos permite a detecção do alvo através de reações de precipitação e visualização no contexto da arquitetura tecidual. A 3,3'-diaminobenzidina (DAB) é o cromógeno mais utilizado nas reações imunoistoquímicas corando em marrom as amostras teciduais. A deposição ocorre através de uma reação redox catalisada por uma enzima conjugada a um anticorpo. Esta reação permite a detecção através da microscopia óptica e avaliação da distribuição e quantidade do marcador alvo nas lâminas preparadas (CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2015).

Esta metodologia, considerada por alguns autores como proteômica *in situ*, é amplamente utilizada em pesquisa e anatomia patológica devido a sua habilidade

em localizar o antígeno em um tecido cuja morfologia é conhecida, sendo de fácil interpretação e tecnicamente simples e pouco onerosa (TAYLOR, 2014; CARVAJAL-HAUSDORF *et al.*, 2015).

1.10 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

1. 10. 1 ÁCIDO RETINÓICO

Ácido retinóico (AR) é o metabólico mais ativo da vitamina A (retinol) cuja função é essencial para muitos processos biológicos, como o desenvolvimento fetal, proliferação, diferenciação e apoptose de células normais e tumorais. Os análogos do retinol são denominados retinóides e a sua principal fonte em muitos animais é a dieta. A conversão das formas precursoras do AR em suas formas ativas ocorre no intestino, fígado e tecidos alvo. O retinol apresenta seis isoformas biologicamente ativas: all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis, 9-cis e 11,13-di-cis (THEODOSIOU; LAUDE; SCHUBERT, 2010).

A atividade biológica do AR depende da presença e atividade de receptores específicos (PASSERI *et al.*, 2016). Os efeitos do AR sobre o controle de expressão gênica são mediados por proteínas nucleares denominadas receptores nucleares, designados receptores do AR (RAR subtipo α , β e γ) e receptores retinóides X (RXR subtipo α , β e γ), e proteínas celulares ligadas ao ácido retinóico (CRABPs) (THEODOSIOU; LAUDE; SCHUBERT, 2010).

O AR desempenha funções na quimioprevenção e tratamento de tumores devido seus efeitos na diferenciação celular, suas ações antiproliferativas, antioxidantes e pró-apoptóticas (BUSHUE; WAN, 2010; FAVORSKAYA *et al.*, 2014). Contudo, o efeito do AR é bastante contraditório. Pode induzir a apoptose e diferenciação ou promover a sobrevida celular. Em determinados tipos celulares, como o neuronal, a função do AR é a sobrevida celular (SCHUG *et al.*, 2007).

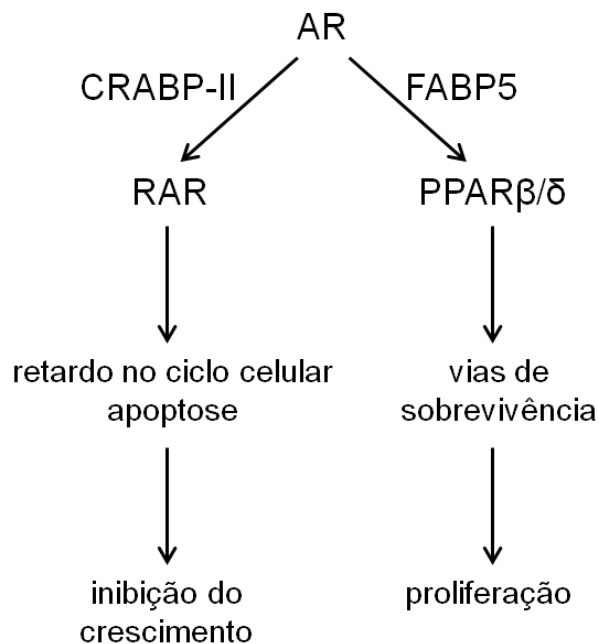
Os efeitos do AR podem ser mediados por receptores retinóides denominados canônicos e não canônicos. Entre os canônicos estão os RAR e RXR, que atuam como fatores de transcrição ligante induzido e pertencem à superfamília de receptores hormonais nucleares. Entre os receptores não canônicos estão o receptor ativado por proliferadores de peroxissoma beta/delta (PPAR β/δ) e receptor órfão beta relacionado ao ácido retinóico (ROR β). Tanto RAR quanto PPAR β/δ se

ligam ao RXR para formar heterodímeros e subsequentemente modular a transcrição gênica (THEODOSIOU; LAUDE; SCHUBERT, 2010).

A distribuição intracelular do AR depende de duas proteínas intracelulares, a CRABP2 e a proteína ligante de ácido graxo 5 (FABP5). As funções do AR dependem da concentração celular destas proteínas e da atividade sobre seus respectivos receptores, RAR α e PPAR β/δ (GUPTA *et al.*, 2012). Na via canônica, a expressão de genes RAR dependentes leva a apoptose e retardo da maturação celular. A ativação do receptor PPAR β/δ promove a proliferação, sobrevivência celular e crescimento tumoral (SHAW; ELHOLM; NOY, 2003; GUPTA *et al.*, 2012).

O efeito desencadeado pela ligação destas proteínas aos seus receptores está associado à relação FABP5/CRABP2. A alta relação FABP5/CRABP2 induz a atividade anti-apoptótica (FIGURA 7) (SCHUG *et al.*, 2007).

FIGURA 7 – MODELO QUE DEFINE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DUPLA DO AR



Nota: CRABP-II e FABP5 alvos do AR para RAR e PPAR β/δ , respectivamente. Em células que expressam uma elevada relação de CRABP-II/FABP5, AR é canalizada para RAR, muitas vezes resultando em inibição do crescimento. Por outro lado, na presença de uma baixa relação de expressão CRABP-II / FABP5, AR é voltada para PPAR β/δ , suprarregulando assim as vias de sobrevivência.

Fonte: Adaptado de SCHUG *et al.*, 2007.

CRABPs são proteínas de baixo peso molecular, intracelulares que atuam na atividade transcricional induzida pelo AR. Estas proteínas transportam o AR lipossolúvel no ambiente intracelular, limitando os níveis de AR livre nas

membranas, solubilizando, estabilizando o AR nos espaços aquosos e protegendo-o do processamento (BLOMHOFF, 1994; NOY, 2000). As CRABPs mantêm o metabolismo adequado do AR e protegem as membranas do AR livre (BLOMHOFF, 1994).

CRABP1 e CRABP2 pertencem à família de proteína de ligação de ácidos graxos com alta similaridade (FAVORSKAYA *et al.*, 2014). A CRABP2 transporta o AR do citoplasma para o núcleo e facilita sua ligação com o RAR e posterior formação de heterodímeros com RXR (FAVORSKAYA *et al.*, 2014). A CRABP2 aumenta a disponibilidade de AR intracelular e seu transporte para o núcleo, sensibilizando a células ao AR (NOY, 2000).

O CRABP2 é uma proteína de 14kDa com alta afinidade ao all-trans-ácido retinóico, expressa em tecidos como pele, útero, ovário e plexo coróide (NOY, 2000; BUSHUE; WAN, 2010). O mecanismo através do qual o CRABP2 libera o AR para os seus sítios de ação e metabolismo, está relacionado à interação entre a proteína ligante e a proteína alvo, denominado canalização ou “channelling” (NOY, 2000). A função da CRABP2 é bastante contraditória. Enquanto alguns estudos relatam a inibição do crescimento celular, outros descrevem a sobrevida das células tumorais (FAVORSKAYA *et al.*, 2014). A explicação para estes efeitos dúbios está no fato de que o papel da CRABP2 na tumorigênese depende do substrato genético associado e do tipo patológico da neoplasia (YANG *et al.*, 2016).

Alguns estudos relatam a expressão anormal de CRABP em neoplasias e a associação com fatores prognósticos, características clínicas e patológicas. Carcinomas pulmonares não pequenas células (adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas) apresentam expressão elevada de CRABP2 em tumores bem e moderadamente diferenciados. A redução na expressão de CRABP2 está associada à metástase em linfonodos neste grupo de tumores. A redução dos níveis de mRNA em amostras com achado concomitante de metástase para linfonodo sugere que a infrarregulação do CRABP2 possa ser um evento desfavorável na progressão da neoplasia, sendo seu papel o de regulador negativo sobre a atividade metastática. A progressão da doença e a redução da diferenciação pode provocar a alteração na via sinalizadora que coordena a expressão do CRABP (FAVORSKAYA *et al.*, 2014).

CRABP2 foi descrito como gene supressor tumoral em carcinomas cutâneos, carcinomas esofágicos e carcinomas de cabeça e pescoço (CALMON *et al.*, 2009; PASSERI *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016). A positividade de CRABP2 a

imunoistoquímica foi descrita no citoplasma e núcleo de células epiteliais escamosas da pele apontando sua participação na diferenciação celular (PASSERI *et al.*, 2016).

Em carcinomas de células escamosas esofágicos, a infrarregulação da expressão de CRABP2 está associada a fatores clínicos e patológicos de pior prognóstico, como profundidade de invasão, diferenciação, estágio e localização tumoral (YANG *et al.*, 2016). Em carcinomas de cabeça e pescoço, a ausência de expressão proteica de CRABP2 está associada ao maior risco de recorrência local ou metástase à distância (CALMON *et al.*, 2009).

Em cultivos celulares de carcinoma ductal de pâncreas a atividade da CRABP2 induzida por AR não exibiu comportamento invasivo (GUPTA *et al.*, 2012).

Ao estudar a expressão de CRABP2 em glioblastomas, Liu *et al.* observaram a expressão proteica citoplasmática de CRABP2 associada à baixa sobrevida. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade biológica do CRABP2 citoplasmática. Especula-se que o acúmulo citoplasmático de CRABP2 possa promover a sobrevida celular, atenuar a atividade transcricional de RAR e inibir a apoptose induzida por AR se vias anti-apoptóticas estiverem suprarreguladas (LIU *et al.*, 2016).

A expressão imuno-histoquímica de CRABP2 já foi descrita em outras neoplasias pediátricas como o retinoblastoma. Tumores com expressão de CRABP2 apresentavam maior agressividade biológica (MALLIKARJUNA *et al.*, 2010). CRABP2 também foi descrito em meduloblastomas como um potencial alvo terapêutico para AR (FU *et al.*, 2012).

Resultados relatados em vários trabalhos apontam para a contribuição da via do AR na progressão tumoral do nefroblastoma. Cogita-se o potencial benefício da terapia com AR induzindo a diferenciação celular. Quando comparados nefroblastomas com quimioterapia pré-cirúrgica e cirurgia como tratamento inicial, observou-se maior expressão da via do AR nos tumores pós-quimioterapia. A superexpressão de CRABP2 foi encontrada em tumores de alto risco. Enquanto a expressão de receptores como RARG, RARRES1 e RARRES3 está reduzida (WEGERT *et al.*, 2011; ZIRN *et al.*, 2005).

Em cultivos celulares houve maturação induzida por AR e a inversão da expressão de genes encontrados em tumores para genes descritos em nefroblastomas de baixo risco e risco intermediário. Não houve indução de maturação terminal do cultivo com a aplicação de AR, no entanto observou-se redução da proliferação celular (WEGERT *et al.*, 2011).

A suprarregulação de CRABP2 foi descrita no blastema de nefroblastomas quando investigados genes relacionados à nefrogênese. A positividade para a imunexpressão de CRABP2 em rins fetais foi detectada no citoplasma e núcleo de células passando pela transição epitélio-mesenquimal após a indução do broto ureteral e na maioria das amostras de nefroblastoma estudadas (MASCHIETTO *et al.*, 2011). Há descrição recente da superexpressão de CRABP2 no blastema de nefroblastomas quando comparada a rins em desenvolvimento mapeada no ganho 1q21.1q23.2 (KREPISCHI *et al.*, 2016).

GUPTA *et al.* descreveram a expressão de CRABP2 e MycN em amostras de nefroblastoma com histologia favorável. Nefroblastomas com estágio avançado (estádio III/IV do NWTS) apresentaram maior expressão de CRABP2 quando comparados aos estádios iniciais (estádio I/II do NWTS) (GUPTA *et al.*, 2008).

1. 10. 2 FATOR NUCLEAR KAPPA B

Fator nuclear kappa B (NFκB) é um fator nuclear descrito em células B ativadas como regulador da transcrição de cadeia leve da imunoglobulina kappa. NFκB é um fator de transcrição nuclear pertencente a família reticuloendoteliose (Rel) que desempenha papel nas respostas imunes, inflamação, proliferação, apoptose, progressão tumoral e diferenciação (HOESEL; SCHMID, 2013). O NFκB é crucial no contexto do tumor ou potenciais células tumorais (MANTOVANI *et al.*, 2008).

A família Rel é composta por cinco fatores de transcrição denominados p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF-κB1 e NF-κB2. Tanto NF-κB1 quanto NF-κB2 são sintetizados como pró-formas, p105 e p100 respectivamente, processadas posteriormente para p50 e p52. Os membros da família Rel podem formar homo ou heterodímeros e exibem semelhanças estruturais como o domínio de homologia Rel (RHD). Em células quiescentes, os dímeros estão ligados a moléculas inibitórias da família das proteínas inibitórias do NFκB (IκB). As IκB apresentando repetições de anquirina que se associam a domínios ligados ao DNA de fatores de transcrição tornando-os inativos (KARIN *et al.*, 2002; HOESEL; SCHMID, 2013).

p105 e p100 também possuem tais repetições clivadas na sua maturação. Estas duas proteínas não apresentam o domínio transativacional presente nos outros membros da família NFκB. Desta forma, dímeros de p50 e p52 que se ligam

aos elementos NFκB dos genes promotores, agem como repressores transcricionais. No entanto, quando o p50 ou p52 estão ligados a membros com domínio transativacional, como RelB ou p65, atuam como ativadores transativacionais. Assim, diferentes dímeros da família NFκB induzem diferentes genes alvo. As subunidades NFκB contém sítios de fosforilação e sofrem outras modificações pós-translacionais que são importantes para a ativação e interferência em vias sinalizadoras. A ligação dos dímeros de NFκB com as moléculas de IκB transloca este complexo do núcleo para o citoplasma, reduzindo a atividade transcricional do NFκB (HOESEL; SCHMID, 2013).

A ativação do NFκB ocorre com a liberação das moléculas de IκB ou pela clivagem dos domínios de repetição da anquirina do p100 e p105, através da degradação proteassomal dos inibidores ou degradação parcial dos precursores. Um dos pré-requisitos para a degradação é a poliubiquitinação de moléculas alvo que requerem a fosforilação dupla específica no substrato, catalizado por enzimas contendo o complexo IκB quinases (IKK1/IKKα e IKK2/IKKβ) e ao menos uma proteína catalítica acessória (modulador essencial do NFκB, NEMO ou IKKγ). O complexo IκB quinases se ligam a componentes adicionais e interagem com outras vias sinalizadoras e quinases. Inúmeros estímulos podem ativar o complexo IKK por diferentes mecanismos incluindo a fosforilação de alças das IKKs, aumento das quinases ou via auto-ativação induzida por proximidade desencadeando a transfosforilação mútua (HOESEL; SCHMID, 2013).

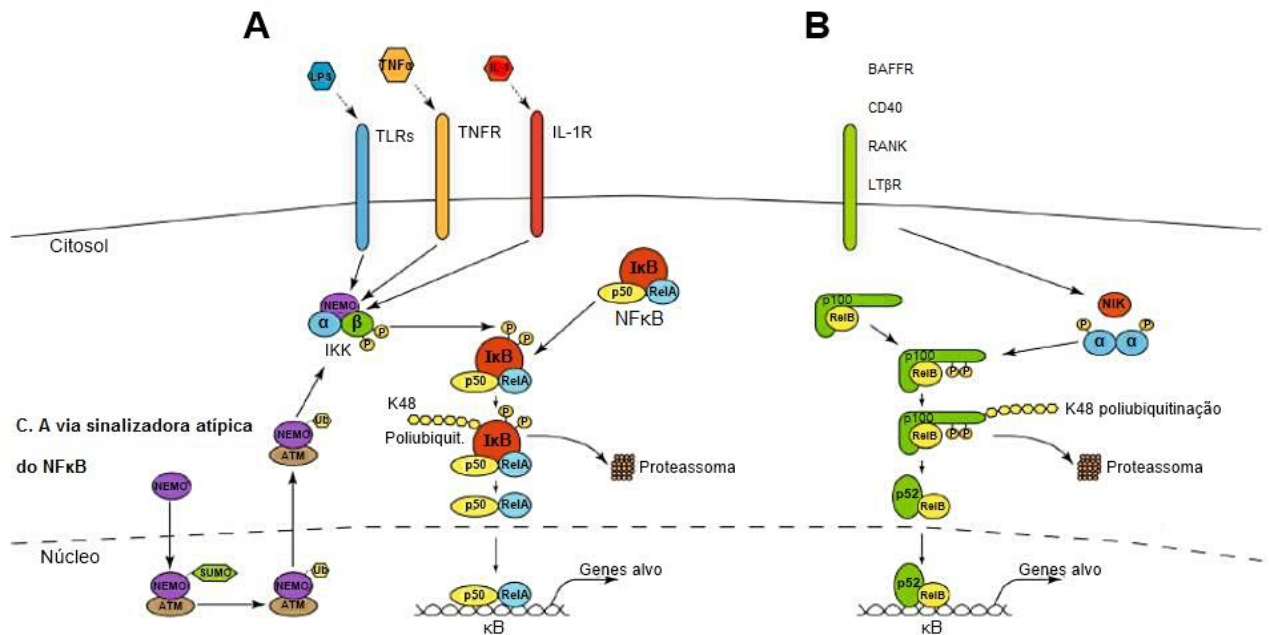
Os vários mecanismos de ativação garantem que todas as situações de estresse possam induzir a atividade catalítica das IKKs levando a liberação e ativação do NFκB em resposta ao estresse, além de interferir em inúmeras vias moleculares e circuitos de retroalimentação permitindo uma resposta harmônica (HOESEL; SCHMID, 2013). São descritas vias de ativação canônica, não canônica ou alternativa e via atípica para a ativação do NFκB (LAWRENCE, 2009).

A via canônica do NFκB é mediada por receptores Toll-like (TLRs), receptor de interleucina 1 (IL-1R), fator de necrose tumoral (TNFR) e receptores de antígeno. O estímulo destes receptores desencadeia a ativação do complexo IKK (LAWRENCE, 2009).

A via não canônica ou alternativa da ativação do NFκB é ativada por uma série de receptores incluindo o fator de ativação da célula B (BAFFR), receptor β da linfotoxina (LTβR), CD40, receptor ativador do NFκB (RANK), TNFR2 e Fn14. A

ativação desta via induz a ativação da quinase NIK com subsequente ativação da IKK1. A NIK induz a fosforilação da p100 resultando na ubiquitinação e degradação parcial para p52 (LAWRENCE, 2009; HOESEL; SCHMID, 2013). O p100 pode se associar a RelB induzindo a formação de complexo transcritionalmente ativo denominado complexo RelB/p52 (FIGURA 8) (HOESEL; SCHMID, 2013).

FIGURA 8 – VIAS SINALIZADORAS CANÔNICA, NÃO CANÔNICA E ATÍPICA DO NFκB



Nota: (A) Na via canônica do NFκB lipopolissacarídeos (LPS), fator de necrose tumoral α (TNFα) ou interleucina 1 (IL-1) ativam receptores Toll-like (TLRs), receptor fator de necrose tumoral (TNFR) e receptor interleucina-1 (IL-1), respectivamente. Através de uma variedade de proteínas adaptadoras e sinalizadoras de quinases ocorre a ativação de IKKβ no complexo IKK, que pode então fosforilar IκBα no resíduo serina S32 e S36. Esta fosforilação é pré-requisito para a poliubiquitinação subsequente, que resulta na degradação proteossomal do IκBα. NFκB homo e heterodímeros podem então ser translocados para o núcleo e ativar os genes de transcrição alvo. (B) Na via não canônica do NFκB, fator de ativação da célula B (BAFFR), CD40, receptor ativador do NFκB (RANK) e receptor β da linfotóxina (LTβR), levam a ativação do IKKα pela quinase indutora de NFκB (NIK). IKKα pode fosforilar o p100 nos resíduos S866 e S870. Esta fosforilação leva a poliubiquitinação do p100 e subsequente processamento para heterodímeros p52.p52-RelB que podem ativar genes de transcrição alvo. (C) Na via atípica da via sinalizadora do NFκB, estresse genotóxico leva a translocação do NEMO para o núcleo onde a sumoilação e subsequentemente ubiquitinação. Este processo é mediado pela quinase ataxia telangiectasia mutada (ATM). NEMO e ATM podem retornar para o citossol onde ativam IKKβ.

Fonte: Modificado de HOESEL; SCHMID, 2013.

Após a liberação de dímeros do NFκB subsequente a ativação do IKK, há deslocamento para o núcleo e a ligação dos domínios de homologia Rel com as sequências de DNA que atuam sobre os genes promotores alvo. Milhares de genes podem ser ativados. Este processo de ativação é controlado por fatores de

transcrição adicionais que podem aumentar ou reduzir a efeito do NFkB (HOESEL; SCHMID, 2013).

As atividades da via NFkB dependem não apenas de uma variedade de fosforilações, mas de interações dinâmicas e complexas entre proteínas que criam uma rede sinalizadora interdependente e alças de retroalimentação. A atividade transcricional do NFkB está relacionada a sua capacidade de suprarregular seu próprios inibidores da família Ikb (HOESEL; SCHMID, 2013).

Os processos inflamatórios estão associados a ativação da via canônica do NFkB. A inflamação e a via NFkB desempenham papéis contraditórios no câncer. A ativação da via NFkB estimula a eliminação de células neoplásicas através do sistema imune, denominada de vigilância imunológica. Ademais, NFkB está ativado em muitos cânceres e pode exercer funções pró-tumorigênicas (HOESEL; SCHMID, 2013).

A ativação do NFkB resulta na suprarregulação de genes antiapoptóticos que resistem à resposta inflamatória induzida pelo estresse. A contribuição da inflamação como evento inicial para o desenvolvimento do câncer, em especial pelo NFkB, é complexa e inclui múltiplos mecanismos. Um dos mecanismos descritos é o controle da transição epitélio-mesenquimal e metástase descrita em carcinomas mamários (HUBER *et al.*, 2004). Além da contribuição do NFkB na progressão tumoral através do controle da vascularização pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores. A ativação do NFkB está associada à angiogênese em glioblastomas (XIE *et al.*, 2010).

A ativação do NFkB resulta na rápida progressão da neoplasia, aumento do potencial metastático, maior proporção de recorrência tumoral e resistência a terapia (HUNTER; LESLIE; PERKINS, 2016).

Fatores intrínsecos e extrínsecos podem estabelecer elevação da atividade do NFkB. Fatores extrínsecos são representados por condições inflamatórias que aumentam o risco de câncer como a doença inflamatória intestinal. Enquanto os fatores intrínsecos seriam alterações genéticas que causam inflamação e neoplasia (MANTOVANI *et al.*, 2008). A atividade do NFkB pode ser melhorada pela indução direta das mutações dos genes NFkB e/ou ativação da via NFkB por oncogenes. O aumento da liberação de citocinas no microambiente tumoral e situações de estresse também aumentariam a atividade do NFkB (BEN-NERIAH, 2011; ZHI *et al.*, 2014).

O NFkB pode ser ativado como resultado de alterações genéticas autônomas (amplificações, mutações ou deleções) das células tumorais (KARIN *et al.*, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2008). As mutações de NFkB em tumores sólidos é rara. O mecanismo pelo qual o NFkB atua na gênese de determinados tipos de cânceres depende do sítio e contexto em que ocorre. A atividade aberrante de NFkB parece ter importante papel como co-fator em tumores sólidos atuando como fator de sobrevivência nas células transformadas, que ficariam apoptóticas ou senescentes. Esta elevada atividade intrínseca do NFkB é atingida pela liberação contínua de citocinas pelos macrófagos do microambiente tumoral (BALKWILL; MANTOVANI, 2001). O NFkB também está ativado em células tronco do câncer promovendo atividade pró-inflamatória, inibindo a apoptose e estimulando proliferação celular (HOESEL; SCHMID, 2013).

O NFkB ativa a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, enzimas da via da síntese das prostaglandinas, óxido nítrico sintase induzível e fatores angiogênicos tanto em células epiteliais, células tumorais e inflamatórias (MANTOVANI *et al.*, 2008).

A elevada atividade do NFkB nas células tumorais promove um mecanismo de sobrevivência através da suprarregulação de genes anti-apoptóticos, representando um fator importante para resistência a drogas (HOESEL; SCHMID, 2013; HUBER *et al.*, 2004).

Muitos estudos descrevem a suprarregulação de NFkB e seus genes alvo presente na maioria dos cânceres. Mesmo cânceres cujo contexto não inclua doenças inflamatórias apresentam alterações do NFkB. A atividade constitutiva do NFkB emergiu como atuante em diversas neoplasias, como leucemias, linfomas e tumores sólidos (KARIN *et al.*, 2002; HUBER *et al.*, 2004).

A expressão de NFkB pode estar associada a pior prognóstico em tumores sólidos (WU *et al.*, 2015). Mutações do NFkB foram descritas em carcinomas mamários, renais, prostáticos, pulmonares não pequenas células, gástricos, esofágicos e ovarianos (JIAO *et al.*, 2012; PERI *et al.*, 2013; OYA *et al.*, 2001; OKERA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2006; LEVIDOU *et al.*, 2007; HARATA *et al.*, 2012; ANNUZIATA, 2010).

A elevação da atividade do NFkB em carcinomas de células claras renal está associada a inativação do gene de Von Hippel Lindau (VHL) que ocorre em mais de 90% dos casos esporádicos (PERI *et al.*, 2013). A perda de genes supressores

como p53 e VHL podem ativar a jusante as funções do NFκB (RIKENBAUGH; BALDWIN, 2016). Entre os genes subordinados ao NFκB está o WT1, gene supressor descrito em nefroblastomas, ativado *in vitro* pela via NFκB (DEHBI; HISCOTT; PELLETIER, 1998).

Em neuroblastomas, a via do NFκB foi descrita como fator conducente para invasão e migração. A produção de citocinas inflamatórias pelas células tumorais ou inflamatórias no microambiente tumoral pode promover a progressão tumoral através da via NFκB (ZHI *et al.*, 2014).

1. 10. 3 PROTEÍNA 1 ASSOCIADA AO FATOR DE NECROSE TUMORAL

As células expostas a insultos ambientais têm a expressão aumentada de proteínas do choque térmico (HSPs) ou proteínas do estresse. A maioria das HSPs são chaperonas moleculares constitutivamente expressas que guiam o dobramento normal, disposição intracelular e *turnover* proteolítico de reguladores chave do crescimento e sobrevivência celular (WHITESELL; LINDQUIST, 2005).

As chaperonas são fundamentais para funções de manutenção essenciais como dobramento proteico *de novo* durante a síntese de cadeia polipeptídica, translocação de proteínas através da membrana, controle de qualidade no retículo endoplasmático e *turnover* proteico normal (WHITESELL; LINDQUIST, 2005; IM, 2016).

As chaperonas também atuam na regulação pós-translacional de moléculas sinalizadoras. As proteínas cliente, proteínas recentemente sintetizadas e inativas, se associam a um complexo composto por múltiplas proteínas que contém chaperonas, co-chaperonas e moléculas acessórias. Esta associação previne a agregação da proteína cliente e auxilia o transporte intracelular, em especial durante a translocação através de estruturas membranosas. A ligação ao complexo chaperona estabiliza as proteínas cliente permitindo sua ativação por estímulos específicos. Na ausência de estímulo, o complexo chaperona pode conduzir a proteína cliente para a via de degradação ubiquitina-proteossoma (WHITESELL; LINDQUIST, 2005).

O aumento da expressão de HSPs em cânceres é descrito tanto para neoplasias sólidas quanto para neoplasias hematológicas. O aumento de HSPs em cânceres avançados reflete uma resposta citoprotetora ao estresse da hipóxia, à

acidose e ao microambiente privado de nutrientes característico dos tumores, chamado de “vício não-oncogênico” (SOLIMINI; LUO; ELLEDGE, 2007). O aumento da atividade das chaperonas permite que a célula tumoral se defronte com os desequilíbrios de sinalização associados às células cancerosas transformadas, através da evasão da apoptose (WHITESELL; LINDQUIST, 2005).

As chaperonas moleculares da família Hsp90 são consideradas reguladoras indispensáveis do enovelamento proteico em virtualmente todos os organismos. Fazem parte da família Hsp90 quatro homólogos: Hsp90 α e β localizadas no citossol, proteína reguladora de glicose 94 (GRP94) localizada no retículo endoplasmático e a proteína 1 associada ao fator de necrose tumoral (TRAP1) localizada predominantemente na matriz mitocondrial (KANG *et al.*, 2012). A TRAP1 ou Hsp75 é uma proteína Hsp90 semelhante de aproximadamente 75 kD ligada ao transporte da proteína do Retinoblastoma (Rb) durante a mitose (ALTIERI *et al.*, 2012; AMOROSO *et al.*, 2014). TRAP1 participa de processos de transdução, dobramento de proteínas, degradação proteica e evolução morfológica (MATASSA *et al.*, 2012).

O mRNA da TRAP1 de aproximadamente 2,4 kb foi descrito em tecidos normais, como músculo esquelético, fígado, coração, cérebro, rim, pâncreas, pulmão e placenta e em linhagens de células tumorais e está localizado no cromossomo 16p13 (SONG *et al.*, 1995; ALTIERI *et al.*, 2012). Há ao menos seis variantes da TRAP1 (TRAP1 1 – 6). A proteína precursora do TRAP1 contém 704 aminoácidos e uma sequência de 59 aminoácidos de importação mitocondrial putativa, que é removida na organela (ALTIERI *et al.*, 2012). A TRAP1 é sintetizada no citoplasma e posteriormente translocada para a mitocôndria onde é maturada (KANG *et al.*, 2012). A lista de proteínas cliente da TRAP1 é pequena e ainda não há descrições de interação com co-chaperonas (MATASSA *et al.*, 2012).

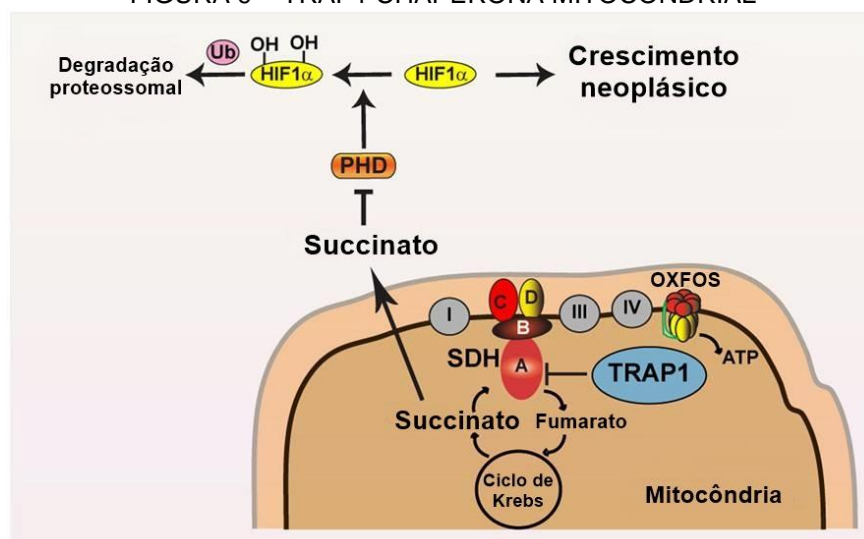
Entre as funções da TRAP1 está a proteção contra apoptose mitocondrial. As células podem entrar em apoptose pela morte celular programada através de uma via extrínseca, centralizada no reconhecimento e propriedades de receptores moleculares na superfície da membrana e uma via intrínseca ou mitocondrial, na qual a indução da disfunção da organela culmina com a liberação de fatores apoptogênicos no citossol (ALTIERI *et al.*, 2012). A superexpressão de TRAP1 cria resistência ao estresse e protege as células cancerosas da apoptose (ZHANG *et al.*,

2015). Como a modulação dos níveis de TRAP1 é controlada em condições de estresse celular é pouco conhecida (ALTIERI *et al.*, 2012).

O impacto do TRAP1 sobre as atividades metabólicas mitocondriais sinaliza para uma via tumorigênica TRAP1 dependente. Entre as ações do TRAP1 está a regulação de troca entre a fosforilação oxidativa (OXPHOS) e a glicólise aeróbica presente nas células cancerosas, esta provavelmente ligada a succinato desidrogenase (SDH) do complexo II da cadeia respiratória (ZHANG *et al.*, 2015). A TRAP1 promove a progressão tumoral inibindo a respiração mitocondrial através da redução da atividade da SDH com consequente estabilização do fator induzido por hipóxia 1 α (HIF1 α) (FIGURA 9) (SCIACOVELLI *et al.*, 2013).

TRAP1 interage com a proteína do Retinoblastoma, ciclofilina D (Cyp-D) na permeabilidade mitocondrial, proteína ligada ao cálcio Sorcina que mantém a localização e estabilidade da mitocôndria, putativa quinase-1 induzida por PTEN (PINK1) protegendo a célula contra a morte induzida por estresse oxidativo e a partícula proteassomal TBP7 controlando a ubiquitinação/degradação de substratos (CHEN *et al.*, 1996; KANG *et al.*, 2007; LANDRISCINA *et al.*, 2010; PRIDGEON *et al.*, 2007; AMOROSO *et al.*, 2012). O TRAP1 tem como ação potencial regular a proliferação de células cancerosas via geração de radicais livres de oxigênio e proteínas relacionadas ao ciclo celular como RB e MYC (IM, 2016).

FIGURA 9 – TRAP1 CHAPERONA MITOCONDRIAL



Nota: TRAP1 se liga e inibe a succinato desidrogenase (SDH), o complexo II da cadeia respiratória. A inibição da respiração desencadeada pela interação entre TRAP1 e SDH promove a tumorigênese pela estabilização succinato-dependente do fator de transcrição proneoplásico HIF1 α independentemente das condições de hipóxia.

Fonte: Adaptado de SCIACOVELLI *et al.*, 2013.

A interação entre a TRAP1 e Cyp-D inibe a abertura do poro de transição de permeabilidade localizado na membrana mitocondrial interna, conferindo a célula resistência a agentes estressores (KANG *et al.*, 2012). Este processo ocorre com a formação de um complexo multichaperona composto pela TRAP1, Hsp60 e Hsp90 (ALTIERI *et al.*, 2012).

A TRAP1 inibe a respiração mitocondrial, prejudica o controle mitocondrial e suprime a produção de ATP (ZHANG *et al.*, 2015).

A TRAP1 está associada a mecanismos de quimioresistência e adaptação ao estresse oxidativo (AMOROSO *et al.*, 2014; IM, 2016). A TRAP1 também está relacionada à tumorigênese e à progressão de diversos tumores como mamário e ovariano (ZHANG *et al.*, 2015; LANDRISCINA *et al.*, 2010). O aumento da atividade anti-apoptótica está presente na maioria dos cânceres e contribui para a sua progressão. A hiperexpressão de TRAP1 contribui para este fenótipo (AMOROSO *et al.*, 2014). A comparação entre a expressão tumoral e em tecidos normais apontam a TRAP1 como potencial biomarcador (LANDRISCINA *et al.*, 2010).

A TRAP1 protege as células do estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (MATASSA *et al.*, 2012). Há estudos relatando a TRAP1 tanto como oncogene quanto gene supressor (SCIACOVELLI *et al.*, 2013; YOSHIDA *et al.*, 2013).

Entre as funções descritas para a TRAP1 estão a capacidade de invasão e motilidade, ambas características da tumorigênese e disseminação metastática. A propriedade de adesão celular descrita em neurônios apontou para o potencial efeito da TRAP1 sobre a invasão e motilidade celular (KUBOTA *et al.*, 2009). Estudos subsequentes demonstraram que a redução ou ausência da TRAP1 se correlaciona com o aumento da motilidade e invasibilidade em linhagens celulares (YOSHIDA *et al.*, 2013).

Muitos estudos avaliaram a expressão da TRAP1 em cânceres. A positividade para TRAP1 está relacionada a altos níveis de genes promotores de proliferação e a negatividade para TRAP1 demonstra altos níveis de genes envolvidos na motilidade celular e disseminação metastática. A expressão de TRAP1 parece inibir as metástases por induzir genes relacionados à adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, junções oclusivas, caderinas, pró-caderinas considerados críticos para processos de invasão e metástase (KUBOTA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010).

A infrarregulação de TRAP1 sensibiliza células de câncer mamário *in vivo* ao estímulo letal e inibe o crescimento tumoral. A ação do TRAP1 sobre a morfologia e função da mitocôndria altera a dinâmica de migração das células tumorais (ZHANG *et al.*, 2015).

A suprarregulação do TRAP1 está presente em alguns tumores (KANG *et al.*, 2007). Uma meta-análise avaliou a expressão de RNAm em diversos tipos de tumores e observou-se que a transcrição de TRAP1 é superior em alguns tumores quando comparada ao tecido normal, como no estômago, próstata e cólon, mas em alguns tumores há redução da expressão quando comparado com o tecido normal, como para carcinomas de bexiga e renais (RAMASAMY, 2010).

A TRAP1 pode estar envolvida no processo de adaptação das células tumorais às novas condições do microambiente face às condições de estresse resultantes da redução de oxigênio e disponibilidade de nutrientes (AMOROSO *et al.*, 2014).

A TRAP1 atua na atividade antiapoptótica extramitocondrial em mecanismos de proteção contra o estresse no retículo endoplasmático, desencadeado por indutores e estresse quimioterápico, regulando a apoptose mitocondrial associada ao retículo endoplasmático, através do controle da expressão de proteínas cliente específicas (AMOROSO *et al.*, 2014).

Imputa-se a TRAP1 a função de proteção ao estresse no retículo endoplasmático em associação à Hsp90 (ALTIERI *et al.*, 2012).

A imunohistoquímica TRAP1 foi descrita em tecidos normais como mamário, cólico, pulmonar e pancreático e em adenocarcinomas pancreáticos, mamários, cólicos, pulmonares e renais (KANG *et al.*, 2007; SI *et al.*, 2015). A expressão imunohistoquímica também foi descrita em gliomas com correlação com prognóstico (LI *et al.*, 2015).

A expressão de TRAP1 em adenocarcinomas cólico é superior a expressão encontrada na mucosa peri-tumoral (COSTANTINO *et al.*, 2009). Recentemente, foi descrita a regulação da ubiquitinação/degradação da β -catenina em células tronco intestinais e provenientes de carcinomas cólicos pela interação TRAP1/TBP7 (LETTINI *et al.*, 2016).

A expressão de TRAP1 em carcinomas renais foi superior à encontrada no tecido renal normal. A expressão de TRAP1 em carcinomas renais foi superior em pacientes com metástase em linfonodo e pior prognóstico (SI *et al.*, 2015).

A atividade da TRAP1 é inibida pela geldamicina e radicicol, semelhante ao descrito para Hsp90 apontando esta chaperona como um potencial alvo terapêutico (MATASSA *et al.*, 2012).

As características descritas da TRAP1 apontam esta HSP como potencial biomarcador e alvo terapêutico (AMOROSO *et al.*, 2014).

1. 10. 4 FATOR DE NECROSE TUMORAL SÍMILE FRACO INDUTOR DE APOPTOSE

Fator de necrose tumoral símile fraco indutor de apoptose (TWEAK) é uma citocina multifuncional que controla muitas atividades celulares incluindo proliferação, migração, diferenciação, apoptose, angiogênese e inflamação (WINKLES, 2008). TWEAK é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF), localizado no cromossomo 17p13, composto por 249 aminoácidos, atua como ligante indutor de morte celular (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; NAKAYAMA *et al.*, 2002). TWEAK é estruturalmente relacionado às citocinas e pode apresenta-se como uma proteína transmembrana tipo II de 1,4-1,5kb e uma molécula clivada solúvel (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; NAKAYAMA *et al.*, 2002; BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002). Como uma proteína tipo II apresenta uma sequência de ancoragem hidrofóbica na região do N-terminal (WILEY *et al.*, 2003).

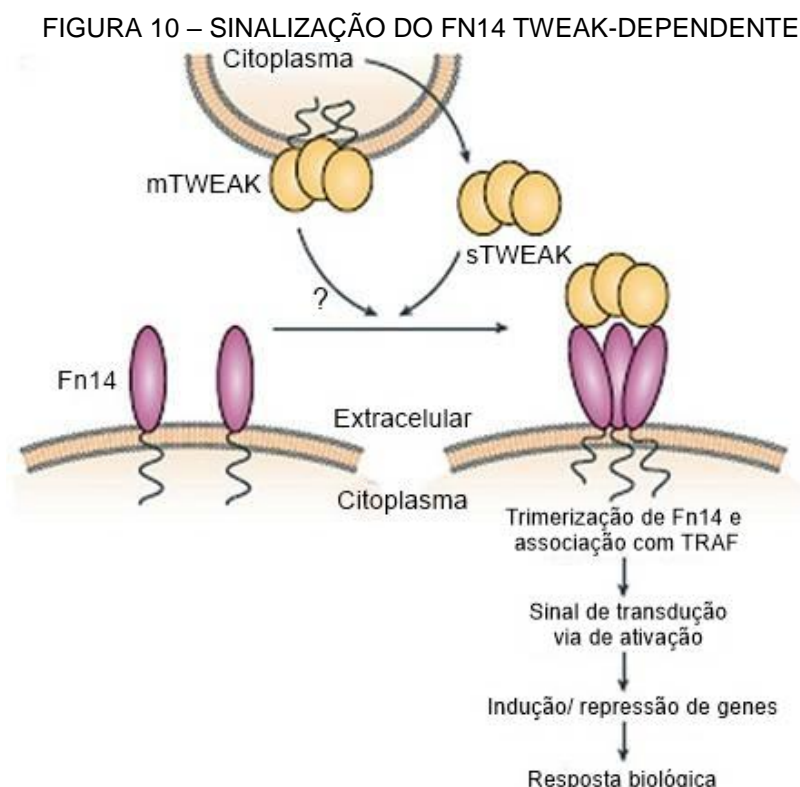
A estrutura básica do TWEAK apresenta um domínio N-terminal citoplasmático com 18 aminoácidos, um domínio transmembrana contendo 25 amoniácidos e um domínio extracelular no C-terminal com 206 aminoácidos com alta sequência de identidade com os outros membros da TNFSF (WILEY *et al.*, 2003).

O ligante do TWEAK pertencente à superfamília dos receptores do TNF (TNFRSF), denominado TweakR/Fn14, é uma proteína transmembrana do tipo I, relatado inicialmente em fibroblastos, recebeu o nome de fator de crescimento de fibroblastos induzível 14 (Fn14) (WILEY *et al.*, 2001).

Há vários estudos indicando que TWEAK é citotóxico a vários cultivos celulares tumorais incluindo células HT-29 de adenocarcinomas cólicos e células Kym-1 de rabdomiossarcoma (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; SCHNEIDER *et al.*, 1999). Células embrionárias renais não apresentaram atividade apoptótica induzida por TWEAK (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997).

As atividades do TWEAK podem ser classificadas em três categorias: (1) proliferação, migração e sobrevivência; (2) indução de citocina; e (3) citotoxicidade e apoptose (WILEY *et al.*, 2003). As atividades relacionadas à proliferação e indução de citocina estão mediadas pela indução direta da TweakR/Fn14. As atividades de citotoxicidade e apoptose podem ou não estar relacionadas à ligação com este receptor (WILEY *et al.*, 2003). Os efeitos do TWEAK devem-se, em algumas situações, a ativação da via sinalizadora do NF- κ B e o aumento de proteínas anti-apoptóticas (WINKLES, 2006).

A interação entre os membros da TNFSF desprovidos de domínio de morte ocorre com a ligação do ligante ao domínio extracelular do receptor induzindo a trimerização do receptor, a associação do fator associado ao TNF (TRAF) com a cauda citoplasmática e a ativação intracelular da via das caspases (FIGURA 10) (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001; BODMER; SCHNEIDER; TSCHOPP, 2002).



Nota: TWEAK é inicialmente sintetizado como uma proteína transmembrana tipo II (denotado como membrana (m) TWEAK), mas esta proteína sofre proteólise intracelular para gerar uma forma menor, biologicamente ativa que é liberada no espaço extracelular (denotado como solúvel (s) TWEAK). Como o processamento proteolítico do mTWEAK não ocorre com 100% de eficiência, TWEAK pode ser detectado na superfície da maioria das células por fluorescência. TWEAK é uma citocina trimérica, e é provável que a ligação do TWEAK promova a trimerização do Fn14, associação do TRAF, ativação da via sinalizadora, mudanças na expressão gênica e, assim, a resposta celular.

Fonte: Adaptado de WINKLES, 2008.

O TWEAK atua sobre o desenvolvimento e diferenciação de células endoteliais (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001).

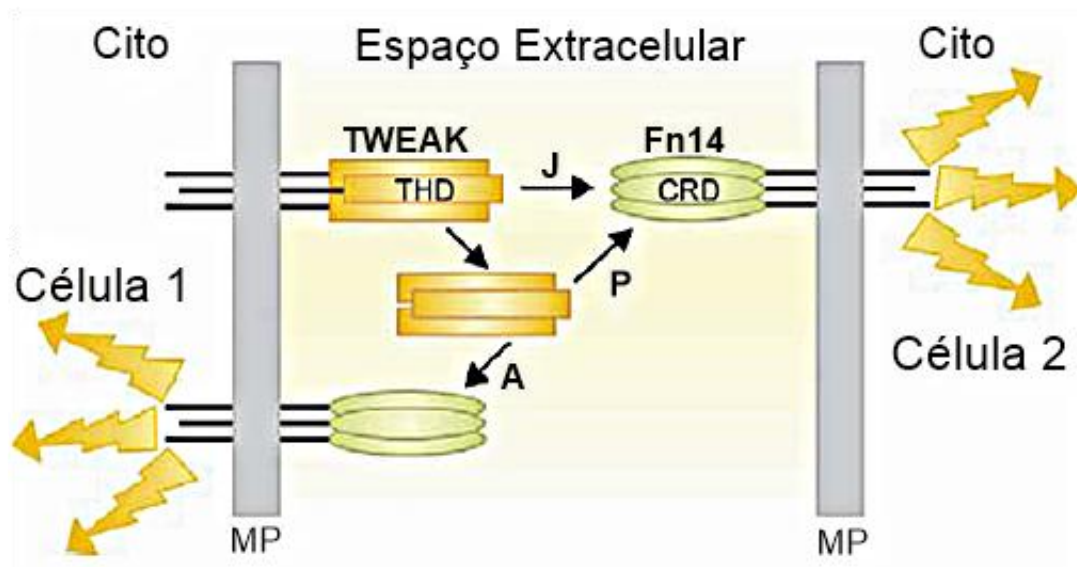
O mecanismo molecular envolvido na inibição do crescimento ou morte celular induzido pelo TWEAK foi descrito em células Kym-1 como um efeito secundário ao TNF endógeno. Enquanto a apoptose de células HT-29 foi descrita como secundária ao co-tratamento com IFN- γ , via caspases (NAKAYAMA *et al.*, 2002).

Os processos celulares associados ao eixo TWEAK-Fn14 como proliferação, invasão, angiogênese e inflamação e a expressão de TWEAK e Fn 14 em tecidos tumorais apontam para a participação destas proteínas no crescimento tumoral e metástase. O TWEAK pode atuar sobre as células tumorais estimulando o crescimento, sobrevivência, migração ou morte celular (WINKLES, 2008).

O TWEAK parece desempenhar atividade pró-apoptótica em subtipos tumorais específicos (WILEY *et al.*, 2003). Em alguns tipos celulares, as funções do TWEAK são a sobrevida celular ou a proliferação (JAKUBOWSKI *et al.*, 2001). Muitas questões são levantadas quanto à citotoxicidade estimulada pelo TWEAK, incluindo quando esta resposta é mediada pela ligação com o TweakR/Fn14 ou outro receptor desconhecido da superfície celular. Embora o mecanismo de indução de apoptose mediada pelo TWEAK não seja tão direta e rápida como ocorre com os demais membros do grupo TNFSF, não se pode afastar a possibilidade da atividade relevante do TWEAK. Pode-se imaginar um programa de crescimento celular seja contrabalanceado por uma fase anti-proliferativa ou citotóxica (WILEY *et al.*, 2003).

O TWEAK liberado pode agir de maneira autócrina sobre as atividades celulares (WILEY *et al.*, 2003). O TWEAK no microambiente tumoral pode modular as propriedades da célula tumoral. O TWEAK pode agir nas células tumorais via mecanismos regulatórios autócrinos ou parácrinos, enquanto o TWEAK ancorado na membrana pode agir através de um mecanismo justácrino (FIGURA 11) (WINKLES, 2006). Os mecanismos de controle da relação entre o solúvel e ancorado é desconhecido (WINKLES, 2008).

FIGURA 11 – FUNÇÕES AUTÓCRINA, PARÁCRINA E JUSTÁCRINA DO TWEAK



Nota: TWEAK derivado das células tumorais pode ter a função de sinalizadora autócrina, parácrina e/ou justácrina. A estimulação autócrina do TWEAK (denotada no diagrama como A) ocorre quando o TWEAK solúvel é liberado de uma célula (célula 1) e se liga aos receptores Fn14 da mesma célula. A estimulação parácrina do TWEAK (denotada no diagrama como P) ocorre quando o TWEAK solúvel liberado de uma célula (célula 1) e se liga aos receptores Fn14 na célula vizinha (célula 2). A estimulação justácrina do TWEAK (denotada no diagrama como J) ocorre quando o TWEAK ancorado na membrana presente na superfície de uma célula (célula 1) se liga aos receptores Fn14 da célula vizinha. Deste modo, a estimulação justácrina é a única que requer o contato célula-célula. Abreviações: Cito, citoplasma; MP, membrana plasmática; THD, domínio de homologia-TNF; CRD, domínio rico em cisteína.

Fonte: WINKLES, 2006.

O RNAm do TWEAK está expresso em uma variedade de tecidos e tipos celulares como coração, cérebro, músculo esquelético, pâncreas, baço, linfonodos e timo (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997; MARSTERS *et al.*, 1998).

TWEAK pode estimular a atividade do NF- κ B como demonstrado em cultivos de células embrionárias renais (MARSTERS *et al.*, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da excelente sobrevida dos pacientes com nefroblastoma atingida pelos atuais protocolos de tratamento, uma parcela destes pacientes recorre, evolui com resistência a terapia ou óbito. Para melhorar a sobrevida destes pacientes busca-se o refinamento da terapia baseado em fatores clínicos e biológicos.

Os grupos cooperativos para o estudo do nefroblastoma buscam incessantemente por novos fatores prognósticos que permitam a estratificação dos pacientes em subgrupos e a adequação das modalidades terapêuticas disponíveis às necessidades específicas de cada paciente. O intuito é atingir os melhores resultados reduzindo a exposição dos pacientes aos efeitos deletérios do tratamento oncológico. Além de desvendar os mecanismos biológicos envolvidos na gênese do nefroblastoma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão proteica tecidual de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK em amostras parafinadas de nefroblastomas através da técnica de imunoistoquímica e correlacionar a imunoexpressão com a evolução clínica e variáveis clínico-patológicas como estadiamento, tipo histológico, presença de metástase ou anaplasia, grupo de risco, comprometimento nodal e tratamento inicial realizado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a expressão imunoistoquímica de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK nos componentes histológicos (blastema, epitélio e estroma) do nefroblastoma.
2. Avaliar a distribuição subcelular (núcleo e citoplasma) de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK em nefroblastomas.
3. Determinar a correlação entre o escore total de Allred obtido através da análise das proteínas AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e:
 - a. evolução clínica;
 - b. estadiamento;
 - c. tipo histológico;
 - d. presença de metástase;
 - e. presença de anaplasia;
 - f. grupo de risco;
 - g. comprometimento nodal;
 - h. tratamento inicial.
4. Determinar a correlação entre a porcentagem obtida através da análise morfométrica das proteínas AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK em nefroblastomas e:

- a. evolução clínica;
- b. estadiamento;
- c. tipo histológico;
- d. presença de metástase;
- e. presença de anaplasia;
- f. grupo de risco;
- g. comprometimento nodal;
- h. tratamento inicial.

4 ARTIGOS

IMUNOEXPRESSÃO DE NFκB, TRAP1 E TWEAK COMO BIOMARCADORES EM NEFROBLASTOMAS

RESUMO

O nefroblastoma, ou tumor de Wilms, é a neoplasia renal mais freqüente na infância. Apesar do prognóstico favorável uma parcela dos pacientes evolui para recidiva e óbito. Biomarcadores atuantes na progressão tumoral, proliferação, apoptose e a recente resposta imune e inflamação, tais como NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK tem sido descritos. Este estudo tem por objetivo a avaliação da expressão imunoistoquímica de NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK em amostras parafinadas de nefroblastomas e correlação com fatores prognósticos. Foram selecionados 77 espécimes de nefroblastoma provenientes dos serviços de patologia de três instituições. Três áreas representativas do tumor e uma área de rim não tumoral foram selecionadas para compor o arranjo tecidual em matriz (TMA). Avaliou-se imunoexpressão através de análise semiquantitativa por meio do escore total de Allred e quantitativa pela análise morfométrica da área corada. Para a comparação de dois grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, enquanto para a comparação de três ou mais grupos utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A imunopositividade para NFκB p100/52 e NFκB p105/50 foi encontrada tanto no núcleo quanto citoplasma. A imunoexpressão de TRAP1 e TWEAK esteve presente apenas no citoplasma das células cancerosas. Todos os tipos histológicos do nefroblastoma (blastema, epitélio e estroma) foram positivos para as quatro proteínas estudadas. Observou-se a maior expressão de NFκB p105/50 em nefroblastomas em estadio I/II ($p= 0.041$). NFκB p105/50 e TRAP1 através da análise semiquantitativa e TWEAK de acordo com análise quantitativa, apresentaram menor positividade em nefroblastomas tipo blastematoso ($p= 0.046$, $p= 0.003$ e $p= 0.066$, respectivamente). A anaplasia se associou a maior escore total de Allred de TRAP1 ($p= 0.005$). A análise semiquantitativa e quantitativa dos marcadores NFκB p105/p50, TRAP1 e TWEAK apontam para potenciais

biomarcadores para progressão tumoral e para a participação destas proteínas na tumorigênese do nefroblastoma.

Palavras-chave: nefroblastoma; NFkB p100/p52; NFkB p105/p50; TRAP1; TWEAK.

INTRODUÇÃO

O nefroblastoma ou tumor de Wilms é a neoplasia maligna renal sólida mais freqüente na infância.¹ O nefroblastoma tem origem nas células do blastema metanéfrico se assemelhando histologicamente ao blastema indiferenciado, estroma e estruturas tubulares renais primitivas do rim fetal, sendo um exemplo da carcinogênese recapitulando o desenvolvimento renal precoce.²

Apesar de taxas de sobrevida global superiores a 85%, questões associadas a morbidade em decorrência do tratamento e óbito após recidiva acometem estes pacientes. O desafio atual dos grupos cooperativos para o tratamento do nefroblastoma é identificar e priorizar o desenvolvimento de novas abordagens para esta parcela de portadores de nefroblastoma que inclui a descoberta de biomarcadores preditores de recidiva e novas modalidades terapêuticas mais efetivas.³

Fator nuclear kappa B (NFkB) é um fator de transcrição nuclear pertencente à família reticuloendoteliose (Rel) que desempenha papel nas respostas imunes, inflamação, proliferação, apoptose, progressão tumoral e diferenciação.⁵ A família Rel é composta por cinco fatores de transcrição denominados p65 (RelA), RelB, c-Rel, NFkB1 (NFkB p105/p50) e NFkB2 (NFkB p100/p52). Tanto NFkB1 quanto NFkB2 são sintetizados como pró-formas, p105 e p100 respectivamente, processadas para p50 e p52.^{5, 6} Os dímeros formados pelos membros da família NFkB induzem diferentes genes alvo e seu papel em células cancerosas inclui funções pró-tumorigênicas.⁵ A ativação do NFkB resulta na rápida progressão da neoplasia, aumento do potencial metastático, maior proporção de recorrência tumoral e resistência a terapia.⁷ O mecanismo pelo qual o NFkB atua na gênese de determinados tipos de cânceres depende do sítio da neoplasia e contexto em que ocorre. A atividade aberrante de NFkB parece ter importante papel como co-fator em tumores sólidos agindo como fator de sobrevivência nas células transformadas, que

ficariam apoptóticas ou senescentes. Esta elevada atividade intrínseca do NFκB é atingida pela liberação contínua de citocinas pelos macrófagos do microambiente tumoral.^{8, 9}

A proteína 1 associada ao fator de necrose tumoral (TRAP1) ou proteína do choque térmico 75 (Hsp75) é uma chaperona molecular da família Hsp90, considerada reguladora indispensável do enovelamento proteico em virtualmente todos os organismos. TRAP1 se localiza predominantemente na matriz mitocondrial e auxilia processos de transdução, dobramento de proteínas, degradação proteica e evolução morfológica.^{10, 11} A TRAP1 está associada a mecanismos de quimioresistência, adaptação ao estresse oxidativo, tumorigênese e progressão em diversos tumores como mamário e ovariano.^{12, 13, 14} A hiperexpressão de TRAP1 contribui para a atividade anti-apoptótica nas células cancerosas.¹²

O fator de necrose tumoral símile fraco indutor de apoptose (TWEAK) é uma citocina multifuncional, membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF), que controla muitas atividades celulares incluindo proliferação, migração, diferenciação, apoptose, angiogênese e inflamação.^{15, 16, 17} Os processos celulares associados ao TWEAK em tecidos tumorais apontam para a participação destas proteínas no crescimento tumoral e metástase.¹⁷

Este estudo tem como objetivo avaliar a expressão proteica de NFκB p105/p50, NFκB p100/p52, TRAP1 e TWEAK em amostras teciduais de nefroblastomas e correlação com fatores prognósticos clínicos e patológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

PACIENTES

Foram selecionados 77 espécimes de nefroblastoma provenientes dos serviços de patologia do Complexo Hospital de Clínicas, Hospital Infantil Pequeno Príncipe e Hospital Erasto Gaertner diagnosticados entre os anos de 1994 e 2012 após a aprovação dos comitês de ética das três instituições.

As lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina foram revisadas e classificadas quanto ao tipo histológico, grupo de risco, estadiamento, presença de anaplasia e comprometimento nodal. Três áreas tumorais distintas representativas dos elementos histológicos de cada espécime foram selecionadas para compor

arranjos teciduais em matriz (TMA). Uma amostra de tecido renal não tumoral de cada amostra foi adicionada ao TMA.

Informações clínicas complementares como gênero dos pacientes, idade ao diagnóstico, apresentação clínica inicial, presença de metástase, modalidade terapêutica e evolução clínica foram obtidas através da revisão de prontuário.

IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoperoxidase seguiram técnica previamente descrita.¹⁸ Para cada reação imunoistoquímica foram executados em paralelo controles positivos e controles negativos pela omissão da incubação do anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo policlonal de coelho anti-NFκB p100/p52 (diluição 1:400, Abcam, Cambrigde, MA, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-NFκB p105/p50 (diluição 1:200, Abcam, Cambrigde, MA, EUA), anticorpo monoclonal de coelho anti-TRAP1 (clone EPR-5381, diluição 1:400, Abcam, Cambrigde, MA, EUA) e anticorpo policlonal de coelho anti-TWEAK (diluição 1:100, Abcam, Cambrigde, MA, EUA).

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA SEMIQUANTITATIVA

O sistema de escore de Allred descrito por Harvey et al. foi avaliado utilizando-se microscópio Leica® DM 500 (Wetzlar, Alemanha). O escore total de Allred varia de 0 a 8 e resulta da somatória de dois escores, de proporção e intensidade. O escore de proporção é classificado segundo a razão entre células positivas e o número total de células, como 0 (0%), 1 (>0-1%), 2 (≥1%-10%), 3 (>10%-33%), 4 (>33-66%) e 5 (>66%-100%). O escore de intensidade é classificado como 0 (negativo), 1+ (fraco), 2+ (moderado) e 3+ (forte).¹⁹

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA QUANTITATIVA

Para análise quantitativa empregou-se a morfometria de cores de imagens digitais no formato JPEG (Joint Photographics Experts Group) obtidas com pelo escâner de lâminas Zeiss, modelo Axio Scan Z1 (Oberkochen, Alemanha), em aumento de 20x. As imagens geradas foram selecionadas. No total de 50 a 80

imagens de cada espécime foram analisadas através da morfometria de cores, utilizando-se programa analisador de imagem, Image Proplus® (Rockville, MD, EUA). A área em micrômetros quadrados de cada fotomicrografia foi compilada, a média calculada para cada caso e transformada em porcentagem, através da divisão pela constante $115.226,1\mu\text{m}^2$ e multiplicação por 100 para a conseguinte análise estatística.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação de dois grupos, em relação a variáveis quantitativas, foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Três ou mais grupos foram comparados usando-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS Statistics v.20.

RESULTADOS

ESTUDO DA POPULAÇÃO

A média de idade ao diagnóstico foi de 33,6 meses (0 - 108 meses). Dados clínicos e demográficos da população estudada estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Características dos pacientes

Variável	Valor
Sexo (feminino/masculino)	31:46
Idade (meses), mediana	33,6
Metástases, <i>n</i> (%)	
Sim	17 (22,4)
Não	59 (77,6) [*]
Grupo de risco histológico, <i>n</i> (%)	
Alto risco	9 (11,7)
Risco intermediário	68 (88,3)

Variável	Valor
Linfonodo, <i>n</i> (%)	
Negativo	36 (46,8)
Positivo	4 (5,2)**
Estádio local, <i>n</i> (%)	
I	47 (64,4)
II	13 (17,8)
III	13 (17,8)***
Classificação histológica, <i>n</i> (%)	
Nefroblastoma – tipo epitelial	10 (13,0)
Nefroblastoma – tipo estromal	9 (11,7)
Nefroblastoma – tipo misto	37 (48,1)
Nefroblastoma – tipo regressivo	4 (5,2)
Nefroblastoma – tipo blastematoso	12 (15,6)
Nefroblastoma – tipo anaplasia difusa	5 (6,5)
Apresentação clínica, <i>n</i> (%)	
Aumento de volume abdominal	31 (40,2)
Massa abdominal	29 (37,7)
Dor abdominal	9 (11,7)
Febre	8 (10,4)
Vômitos	3 (3,9)
Emagrecimento	3 (3,9)
Tratamento inicial, <i>n</i> (%)	
Quimioterapia	51 (67,1)*
Cirurgia	32,9 (25,0)
Evolução clínica, <i>n</i> (%)	
Livre de doença	57 (83,8)
Óbito	11 (16,2)****

* = dado não pode ser recuperado; ** = demais pacientes não foram submetidos à ressecção de linfonodos; *** = espécimes com estadiamento prejudicado; **** = pacientes com perda de seguimento ou transferidos para outro centro durante o estudo.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A imunopositividade para os marcadores avaliados foi observada em todos os elementos histológicos do nefroblastoma (blastema, estroma e epitélio) (Figura 1). Os marcadores NFkB p100/p52 e NFkB p105/p50 apresentaram distribuição subcelular tanto citoplasmática quanto nuclear em respectivamente, 93,1% e 12,9% das amostras. Enquanto os marcadores TRAP1 e TWEAK apresentaram imunoexpressão citoplasmática.

As amostras de tecido renal normal também foram positivas para os quatro marcadores. Estruturas como túbulos renais e glomérulos expressaram NFkB p100/p52 tanto em núcleo quanto citoplasma. Os demais marcadores foram expressos apenas no citoplasma.

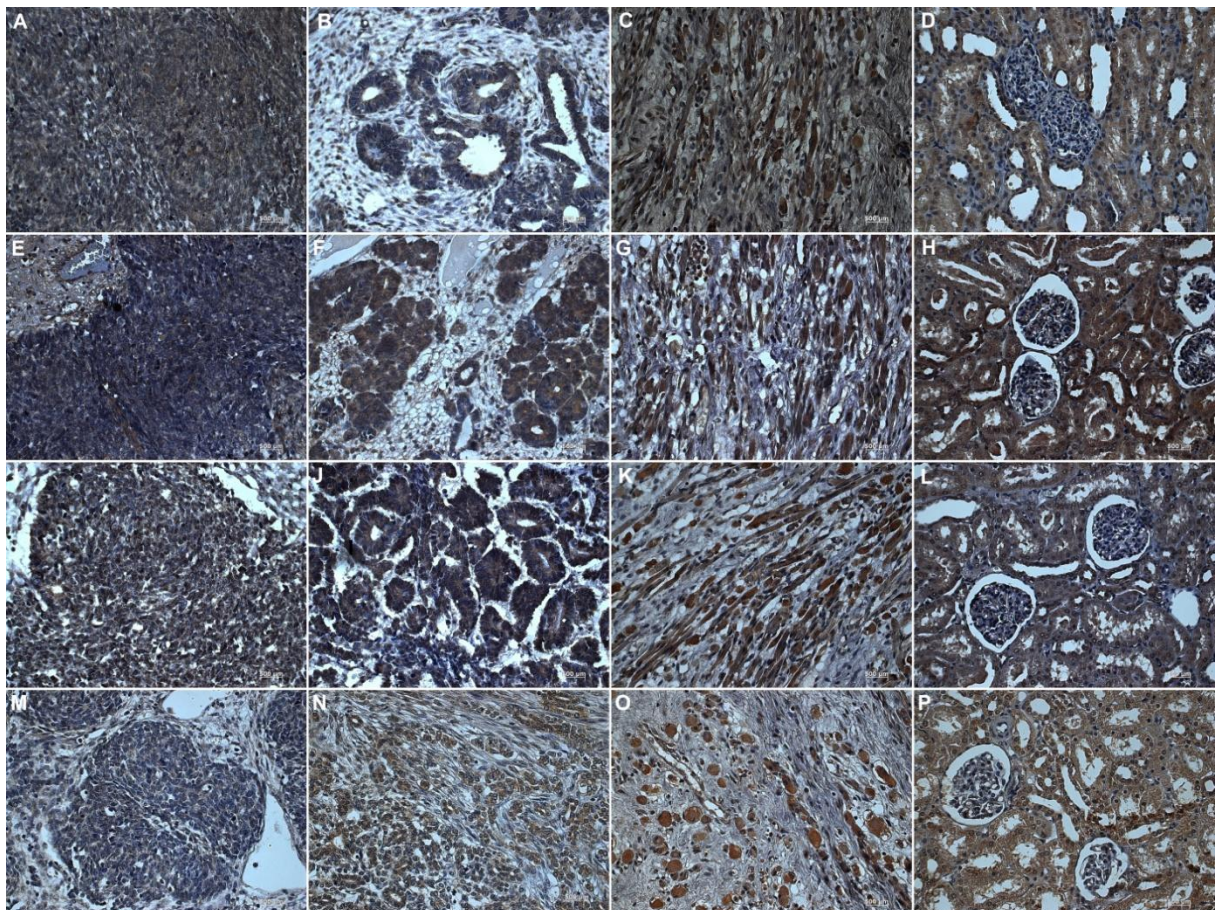


Figura 1. Expressão imunoistoquímica em amostras de tecido renal e componentes histológicos do nefroblastoma, blastema, epitélio e estroma respectivamente. A, B, C e D imunoexpressão de NFkB p100/p52; E, F, G e H imunoexpressão de NFkB p105/p50; I, J, K e L imunoexpressão de TRAP1; M, N, O e P imunoexpressão de TWEAK (40x).

A distribuição da imunoexpressão avaliada pelo sistema de escore de Allred está resumida na figura 2.

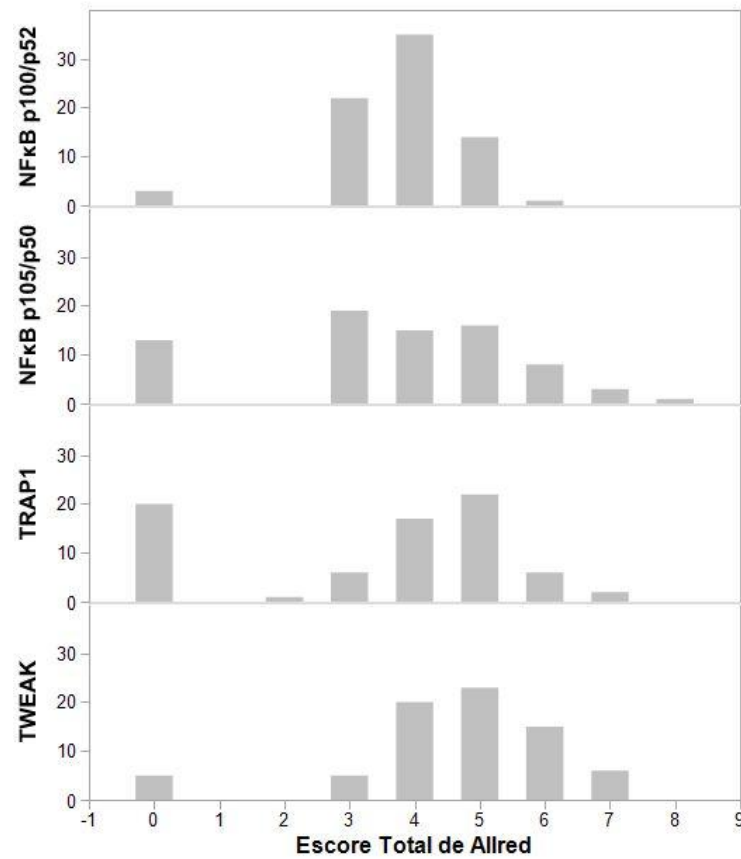


Figura 2. Distribuição da imunoexpressão tecidual em nefroblastomas de acordo com o sistema de escore de Allred

A distribuição das imunoexpressão de acordo com a análise morfométrica está ilustrada na figura 3.

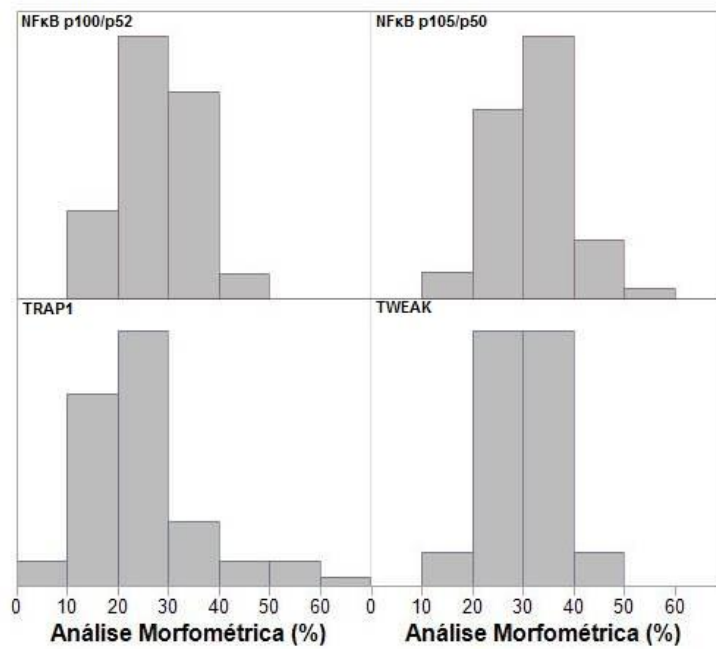


Figura 3. Distribuição da Imunoexpressão em nefroblastomas segundo a análise morfométrica (%)

RELEVÂNCIA PROGNÓSTICA

Os resultados obtidos através da análise quantitativa e semiquantitativa foram comparados com variáveis clínico-patológicas com relevância prognóstica.

Não houve significância estatística entre as duas metodologias de avaliação da imunopositividade, evolução clínica e comprometimento nodal para os quatro marcadores ($p > 0.05$).

As variáveis que apresentaram correlação estatística com relação as análises quantitativa e semiquantitativa são ilustradas na figura 4.

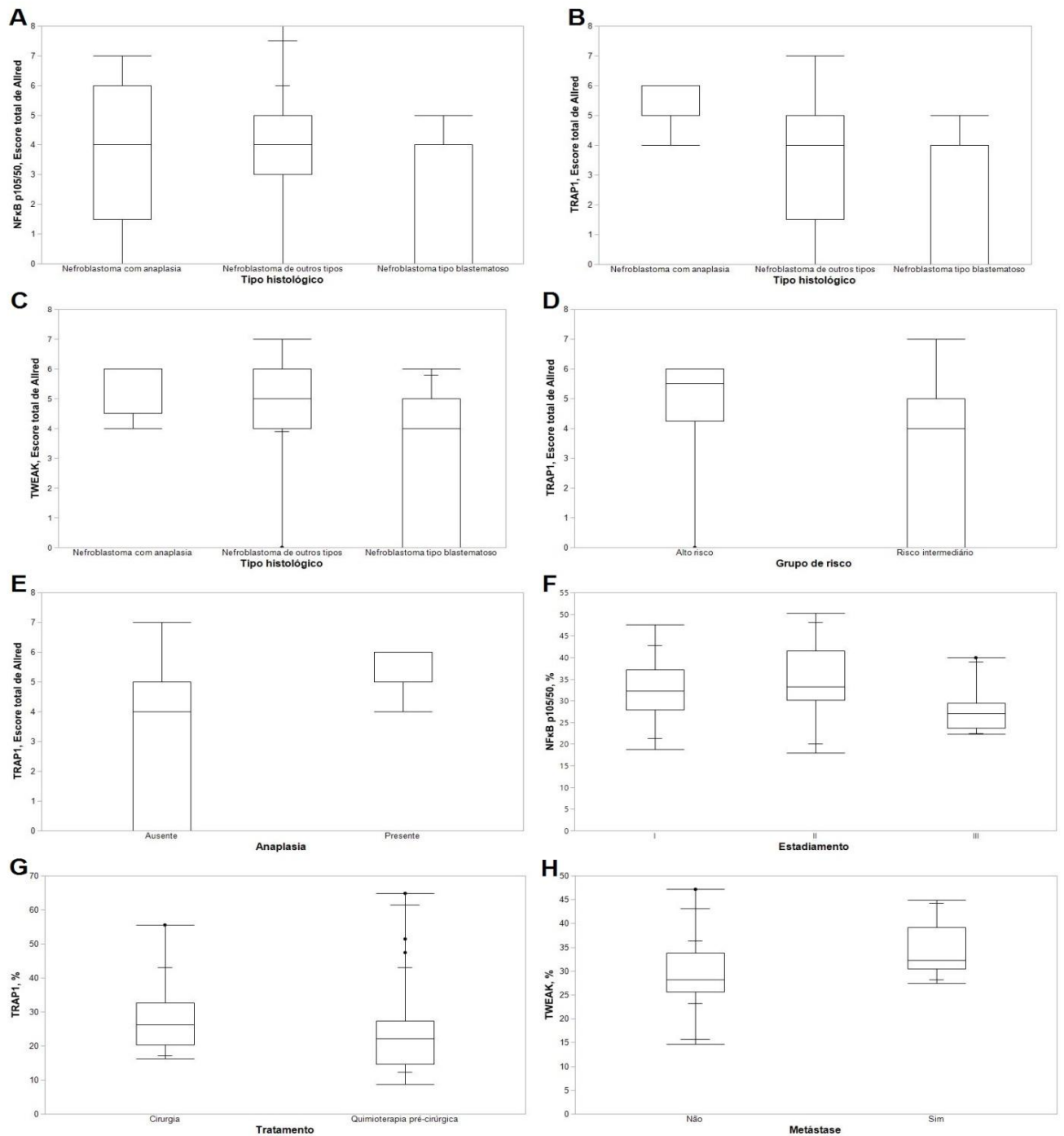


Figura 4. Análise quantitativa e semiquantitativa da imunexpressão de NFκB p105/p50, TRAP1 e TWEAK com relação às variáveis clínico-patológicas. A. Box-plot da análise semiquantitativa da imunexpressão de NFκB p105/p50 comparada ao tipo histológico. Observa-se a menor expressão em nefroblastomas blastematosos ($p = 0.046$); B. Box-plot da análise semiquantitativa da imunexpressão de TRAP1 comparada ao tipo histológico. Observa-se a menor expressão em nefroblastomas blastematosos ($p = 0.003$); C. Box-plot da análise semiquantitativa da imunexpressão de TWEAK comparada ao tipo histológico. Observa-se a menor expressão em nefroblastomas blastematosos ($p = 0.066$); D. Box-plot da análise semiquantitativa da imunexpressão de TRAP1 comparada ao grupo de risco ($p = 0.015$); E. Box-plot da análise semiquantitativa da imunexpressão de TRAP1 comparada a presença de anaplasia. Observa-se a maior expressão em nefroblastomas com anaplasia ($p = 0.005$); F. Box-plot da análise quantitativa da imunexpressão de NFκB p105/p50 comparada ao estadiamento. Observa-se a maior expressão nos estádios I e II quando comparadas ao estadio III ($p = 0.041$); G. Box-plot da análise quantitativa da

imunoexpressão de TRAP1 comparada ao tratamento inicial ($p= 0.036$); H. Box-plot da análise quantitativa da imunoexpressão de TWEAK comparada a presença de metástase ($p= 0.046$).

DISCUSSÃO

Este trabalho descreve a imunoexpressão de NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK em amostras teciduais de nefroblastoma como potenciais biomarcadores em nefroblastoma, até o momento não descrita.

As funções do NFkB não se restringem apenas a processos inflamatórios e a imunidade. Suas ações como fator de transcrição conecta-o a funções essenciais à tumorigênese como proliferação, apoptose e migração celular.⁶ A expressão nuclear e citoplasmática de NFkB se correlacionam com diagnóstico desfavorável, fato explicado pela coativação de outros fatores biológicos.⁹ O mecanismo pelo qual o NFkB atua na gênese de determinados tipos de cânceres depende do sítio e contexto em que ocorre. A atividade aberrante de NFkB parece ter importante papel como co-fator em tumores sólidos atuando como fator de sobrevivência nas células transformadas através da suprarregulação de genes anti-apoptóticos.⁸

Em nossa amostra, não houve correlação entre a expressão proteica de NFkB p100/p52 e NFkB p105/p50 em nefroblastomas e a evolução clínica. Nefroblastomas tipo blastematoso apresentaram menor expressão de NFkB p105/p50 quando comparados aos demais tipos histológicos. Embora os blastematosos e anaplásicos pertençam ao mesmo grupo de risco, estes dois tipos histológicos de pior prognóstico, foram diferentes quanto a expressão deste marcador. No entanto, quando comparada a imunoexpressão com os grupos de risco, não observou-se correlação estatística entre tumores de risco intermediário e alto risco.

Nefroblastomas estadios iniciais (I/II) demonstraram maior expressão de NFkB p105/p50 quando comparados ao estadio III. Diferindo do relatado em melanomas e carcinomas gástricos.^{20, 21}

TRAP1 é parte de uma rede complexa de proteínas que atuam na proteção das células contra o estresse oxidativo e apoptose.¹⁴ A TRAP1 pode agir na capacidade de invasão e motilidade, reconhecidas como características da tumorigênese e disseminação metastática.²² A redução ou ausência da TRAP1 se correlaciona com o aumento da motilidade e invasibilidade em linhagens celulares e

a expressão de TRAP1 está relacionada a altos níveis de genes promotores de proliferação celular.^{22, 23}

A imunoexpressão de TRAP1 foi maior em nefroblastomas com anaplasia e de alto risco. No entanto, não houve correlação com a evolução clínica dos pacientes, metástase à distância e comprometimento nodal.

A expressão imunoistoquímica de TRAP1 em gliomas de baixo grau, carcinomas pulmonares não pequenas células e adenocarcinomas cólicos está associada a pior prognóstico.^{24, 25, 26} Amostras de carcinomas ovarianos pouco diferenciados, com estadio avançado e metástase à distância e para linfonodos apresentaram maior expressão proteica de TRAP1.²⁷ A expressão de TRAP1 em carcinomas renais foi maior em pacientes com metástase em linfonodo e pior prognóstico.²⁸

TWEAK, pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral, age sobre as células alvo ligando-se ao seu receptor Fn14. Os processos celulares relacionados ao eixo TWEAK-Fn14 como proliferação, invasão, angiogênese e inflamação em tecidos tumorais apontam para a participação destas proteínas no crescimento tumoral e metástase.¹⁷ O TWEAK parece desempenhar atividade pró-apoptótica em subtipos tumorais específicos.²⁹

A expressão proteica de TWEAK em nossa amostra foi menor em nefroblastomas tipo blastematoso. Em carcinomas renais a maior expressão da proteína TWEAK ocorreu em tumores de maior grau histológico.³⁰ Semelhante ao observado nos nefroblastomas anaplásicos selecionados para este estudo.

As amostras provenientes de pacientes com nefroblastoma metastático apresentaram maior expressão de TWEAK salientando o possível papel desta proteína no crescimento tumoral e metastático.

Concluindo, este estudo demonstra que a análise semiquantitativa e quantitativa dos marcadores NFkB p105/p50, TRAP1 e TWEAK apontam para potenciais biomarcadores de progressão tumoral e para a participação destas proteínas na tumorigênese do nefroblastoma. Estudos complementares são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. STILLER CA, PARKIN DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br. Med. Bull.* 1996; 52; 682-703.
2. MASCHIETTO M, TRAPÉ AP, PICCOLI FS, RICCA TI, DIAS AAM, COUDRY RA, GALANTE PA, TORRES C, FAHHAN L, LOURENÇO S, GRUNDY PE, CAMARGO B, SOUZA S, NEVES EJ, SOARES FA, BRENTANI H, CARRARO DM. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. *Cell Death Dis.* 2011; 2; e224.
3. PRITCHARD-JONES K, MOROZ V, VUJANIC G, POWIS M, WALKER J, MESSAHEL B, HOBSON R, LEVITT G, KELSEY A, MITCHELL C. Treatment and outcome of Wilms' tumour patients: an analysis of all cases registered in the UKW3 trial. *Ann. Oncol.* 2012; 23; 2457-2463.
4. IRTAN S, EHRLICH PF, PRITCHARD-JONES K. Wilms tumor: "state-of-the-art" update, 2016. *Semin Pediatr Surg.* 2016; 25(5): 250-256.
5. HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer.* 2013; 12; 86.
6. KARIN M, CAO Y, GRETEN FR, LI ZW. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer.* 2002; 2; 301-310.
7. HUNTER JE, LESLIE J, PERKINS ND. c-Rel and its many roles in cancer: an old stor with new twists. *Br. J. Cancer.* 2016; 114; 1-6.
8. BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357; 539-545.
9. WU D, WU P, ZHAO L, HUANG L, ZHANG Z, ZHAO S, HUANG J. NF- κ B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Medicine.* 2015; 94; e1687.
10. MATASSA DS, AMOROSO MR, MADDALENA F, LANDRISCINA M, ESPOSITO F. New insights into TRAP1 pathway. *Am. J. Cancer Res.* 2012; 2; 235-248.
11. KANG BH. TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-target TRAP1 inhibitors. *BMB Rep.* 2012; 45; 1-6.
12. AMOROSO NR, MATASSA DS, SISINNI L, LETTINI G, LANDRISCINA M, ESPOSITO F. TRAP1 revisited: novel localizations and functions of a 'next-generation' biomarker (Review). *Int. J. Oncol.* 2014; 45; 969-977.
13. ZHANG B, WANG J, HUANG Z, WEI P, LIU Y, HAO J, ZHAO L, ZHAO L, ZHANG F, TU Y, WEI T. Aberrantly upregulated TRAP1 is required for tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget.* 2015; 6; 44495-44508.
14. LANDRISCINA M, AMOROSO MR, PISCAZZI A, ESPOSITO F. Heat shock proteins, cell servical and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potencial novel target for ovarian cancer therapy. *Gynecol. Oncol.* 2010; 117; 177-182.
15. CHICHEPORTICHE Y, BOURDON PR, XU H, HSU YM, SCOTT H, HESSION C, GARCIA I, BROWNING JL. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272; 32401-32410.
16. JAKUBOWSKI A, BROWNING B, LUKASHEV M, SIZING I, THOMPSON JS, BENJAMIN CD, HSU YM, AMBROSE C, ZHENG TS, BURKLY LC. Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. *J. Cell Sci.* 2001; 115; 267-274.

17. WINKLES JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008; 7; 411-425.
18. CHONG DC, RABONI SM, ABUJAMRA KB, MARANI DM, NOGUEIRA MB, TSUCHIYA LRV, NETO HJC, FLIZIKOWSKI FBZ, NORONHA L. Respiratory viruses in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol*, 2009; 12(3); 211-16.
19. HARVEY J, CLARK G, OSBORNE C, ALLRED D. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17; 1474-1481.
20. GAO K, DAI DL, MARTINKA M, LI G. Prognostic significance of nuclear factor- κ B p105/p50 in Human Melanoma and its role in cell migration. *Cancer Res.* 2006; 66; 8382-8388.
21. LEVIDOU G, KORKOLOPOULOU P, NIKITEAS N, TZANAKIS N, THYMARA I, SAETTA AA, TSIGRIS C, RALLIS G, VLASIS K, PATSOURIS E. Expression of nuclear factor κ B in human gastric carcinoma: relationship with I κ B α and prognostic significance. *Virchows Arch.* 2007; 450; 519-527.
22. KUBOTA K, INOUE K, HASHIMOTO R, KUMAMOTO N, KOSUGA A, TATSUMI M, KAMIJIMA K, KUNUGI H, IWATA N, OZAKI N, TAKEDA M, TAHYAMA M. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression. *J. Neurochem.* 2009; 110; 496-508.
23. YOSHIDA S, TSUTSUMI S, MUHLEBACH G, SOURBIER C, LEE MJ, LEE S, VARTHOLOMAIOU E, TATOKORO M, BEEBE K, MIYAJIMA N, MOHNEY RP, CHEN Y, HASUMI H, XU W, FUKUSHIMA H, NAKAMURA K, KOGA F, KIHARA K, TRPEL J, PICARD D, NECKERS L. Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. America.* 2013; 110; E1604-E1612.
24. HAN JJ, BAEK SK, LEE JJ, KIM GY, KIM SY, LEE SH. Combination of TRAP1 and ERCC1 expression predicts clinical outcomes in metastatic colorectal cancer treated with oxliplatin/5-fluorouracil. *Cancer Res. Treat.* 2014; 46; 55-64.
25. AGORRETA J, HU J, LIU D, DELIA D, TURLEY H, FERGUSON DJP, IBORRA F, PAJARES MJ, LARRAYOZ M, ZUDAIRE I, PIO R, MONTUENGA LM, HARRIS AL, GATTER K, PEZZELLA F. TRAP1 regulates proliferation, mitochondrial function, and has prognostic significance in NSCLC. *Mol. Cancer Res.* 2014; 12; 660-669.
26. LI S, LV Q, SUN H, XUE Y, WANG P, LIU L, LI Z, LI Z, TIAN X, LIU Y. H. Expression of TRAP1 predicts poor survival of malignant glioma patients. *J. Mol. Neurosci.* 2015; 55; 62-68.
27. LV Q, SUN H, CAO S, GAO B, QI Y. Overexpression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) are associated with poor prognosis of epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2016; 37; 2731-2727.
28. SI T, YANG G, QIU X, LUO Y, LIU B, WANG B. Expression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 and its clinical significance in kidney cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8; 13090-13095.
29. WILEY SR, WINKLES JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003; 14; 241-249.
30. PELEKANOU V, NOTAS G, THEODOROPOULOU K, KAMPA M, TAKOS D, ALEXAKI VI, RADOJICIC J, SOFRAS F, TSAPIS A, SATHIPOULOS EM,

CASTANAS E. Detection of the TNFSF members BAFF, APRIL, TWEAK and their receptors in normal kidney and renal cell carcinoma. *Anal. Cell. Pathol.* 2011; 34; 46-60.

Diagnostic Pathology

TISSUE EXPRESSION OF RETINOIC ACID AND CRABP2 IN METASTATIC NEPHROBLASTOMAS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	DPAT-D-17-00189					
Full Title:	TISSUE EXPRESSION OF RETINOIC ACID AND CRABP2 IN METASTATIC NEPHROBLASTOMAS					
Article Type:	Research					
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Universidade Federal do Paraná</td><td>Not applicable</td></tr> <tr> <td>Pontificia Universidade Católica do Paraná</td><td>Dr Ana Paula Percicote</td></tr> </table>		Universidade Federal do Paraná	Not applicable	Pontificia Universidade Católica do Paraná	Dr Ana Paula Percicote
Universidade Federal do Paraná	Not applicable					
Pontificia Universidade Católica do Paraná	Dr Ana Paula Percicote					
Abstract:	<p>Background: Nephroblastoma, or Wilms' tumor, is the most frequent kidney cancer in children, accounting for 98% of kidney tumors in this age group. Despite the favorable prognosis, a portion of these patients progress to recurrence and death. The retinoic acid (RA) pathway plays a role in the chemoprevention and treatment of tumors due to its effects on cell differentiation and its antiproliferative, anti-oxidant, and pro-apoptotic actions. Reports describe abnormal cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) expression in neoplasms and a correlation with prognostic factors and clinical and pathological characteristics. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of RA and CRABP2 in paraffin samples of nephroblastomas, through semiquantitative and quantitative analysis, and correlate this expression with prognostic factors.</p> <p>Methods: Seventy-seven cases of nephroblastomas were selected from pediatric oncology services. The respective medical records and surgical specimens were reviewed. Three representative tumor samples and one non-tumor renal tissue sample were selected for the preparation of tissue microarrays (TMA). The Allred scoring system was used for the semiquantitative immunohistochemical analysis, whereas a morphometric analysis of the stained area was employed for the quantitative evaluation. The nonparametric Mann-Whitney test was used for comparisons of two groups, while the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare three or more groups.</p> <p>Results: Immunopositivity for RA and CRABP2 was found in both the nucleus and cytoplasm. All histological components of the nephroblastoma (blastema, epithelium, and stroma) were positive for both markers. RA in the semiquantitative analysis and CRABP2 in the quantitative analysis presented increased immunohistochemical expression in patients with metastasis, with p values of 0.0247 and 0.0128, respectively. This is similar to the results of the quantitative analysis of RA, which showed greater immunopositivity in tumor samples of patients subjected to pre-surgical chemotherapy. No significant correlation was found with the other variables studied, such as staging, anaplasia, risk group, histological type, nodal involvement, and clinical evolution.</p> <p>Conclusions: Semiquantitative and quantitative analyses of the markers RA and CRABP2 indicate their potential as biomarkers for tumor progression and their participation in nephroblastoma tumorigenesis.</p>					
Corresponding Author:	Ana Paula Percicote, M.D. Universidade Federal do Parana BRAZIL					
Corresponding Author Secondary Information:						
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Parana					
Corresponding Author's Secondary Institution:						
First Author:	Ana Paula Percicote, M.D.					
First Author Secondary Information:						

Order of Authors:	Ana Paula Percicote, M.D.
	Gabriel Lazaretti Mardegan
	Elizabeth Schneider Gugelmim
	Sérgio Ossamu Ioshii
	Ana Paula Kuczynski
	Seigo Nagashima
	Lúcia Noronha
Order of Authors Secondary Information:	

TISSUE EXPRESSION OF RETINOIC ACID AND CRABP2 IN METASTATIC NEPHROBLASTOMAS

Ana Paula Percicote, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

e-mail: apercicote@gmail.com

Gabriel Lazaretti Mardegan, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

e-mail: glazaretti@gmail.com

Elizabeth Schneider Gugelmim, Anatomic Pathology Service at the Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba, Brazil

e-mail: elizabeth@gugelmin.com

Sergio Ossamu Ioshii, Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná and School of Health of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

e-mail: sergioioshii@gmail.com

Ana Paula Kuczynski, Oncology Service at the Pequeno Príncipe Hospital, Curitiba, Brazil

e-mail: ana.kuczynski@hpp.org.br

Seigo Nagashima, School of Health of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

e-mail: seigo_nagashima@hotmail.com

Lúcia de Noronha, Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná and School of Health of the Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

e-mail: Inno@terra.com.br

Corresponding author: Ana Paula Percicote

ABSTRACT

Background: Nephroblastoma, or Wilms' tumor, is the most frequent kidney cancer in children, accounting for 98% of kidney tumors in this age group. Despite the favorable prognosis, a portion of these patients progress to recurrence and death. The retinoic acid (RA) pathway plays a role in the chemoprevention and treatment of tumors due to its effects on cell differentiation and its antiproliferative, anti-oxidant, and pro-apoptotic actions. Reports describe abnormal cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) expression in neoplasms and a correlation with prognostic factors and clinical and pathological characteristics. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of RA and CRABP2 in paraffin samples of nephroblastomas, through semiquantitative and quantitative analysis, and correlate this expression with prognostic factors.

Methods: Seventy-seven cases of nephroblastomas were selected from pediatric oncology services. The respective medical records and surgical specimens were reviewed. Three representative tumor samples and one non-tumor renal tissue sample were selected for the preparation of tissue microarrays (TMA). The Allred scoring system was used for the semiquantitative immunohistochemical analysis, whereas a morphometric analysis of the stained area was employed for the quantitative evaluation. The nonparametric Mann-Whitney test was used for comparisons of two groups, while the nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare three or more groups.

Results: Immunopositivity for RA and CRABP2 was found in both the nucleus and cytoplasm. All histological components of the nephroblastoma (blastema, epithelium, and stroma) were positive for both markers. RA in the semiquantitative analysis and CRABP2 in the quantitative analysis presented increased immunohistochemical expression in patients with metastasis, with p values of 0.0247 and 0.0128, respectively. This is similar to the results of the quantitative analysis of RA, which showed greater immunopositivity in tumor samples of patients subjected to pre-surgical chemotherapy. No significant correlation was found with the other variables studied, such as staging, anaplasia, risk group, histological type, nodal involvement, and clinical evolution.

Conclusions: Semiquantitative and quantitative analyses of the markers RA and CRABP2 indicate their potential as biomarkers for tumor progression and their participation in nephroblastoma tumorigenesis.

Keywords: nephroblastoma; retinoic acid; CRABP2.

BACKGROUND

Nephroblastoma or Wilms' tumor is the most frequent kidney cancer in children and accounts for 98% of kidney tumors in this age group [1]. Nephroblastoma originates in metanephric blastema cells that histologically resemble the undifferentiated blastema, stroma, and primitive renal tubular structures of the fetal kidney [2]. The prognosis of this cancer improved dramatically after the formation of cooperative groups. The development of treatment protocols resulted in global survival rates above 90% [3].

Despite this therapeutic success, prognostic factors such as lymph node metastases, anaplastic histology, bilateral disease, molecular characteristics, stage III/IV, tumor rupture, and renal vein and inferior vena cava thrombi are associated with relapse and reduced survival [3,4,5].

In the frantic search for new therapeutic targets and a better understanding of the molecular pathways responsible for tumorigenesis and tumor progression of nephroblastoma, retinoic acid (RA) has emerged as a therapeutic alternative for the treatment of this cancer. Numerous genes involved in the RA signaling pathway seem to participate in the progression and cellular differentiation of nephroblastoma [6,7].

RA is the most active metabolite of vitamin A, and its function is essential for many biological processes, such as fetal development and proliferation and the differentiation and apoptosis of normal and tumor cells [8]. The effects of RA on the control of gene expression depend on the intracellular RA distribution subordinate to the concentration of intracellular proteins such as cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) and to the activity on RA receptors [8,9,10]. The functions of RA include the chemoprevention and treatment of tumors due to its effects on cell differentiation and its antiproliferative, anti-oxidant and pro-apoptotic actions [10,11]. CRABPs are low-molecular-weight, intracellular proteins that act on the RA-induced transcriptional activity, maintaining an adequate RA metabolism [13].

Previous studies have described changes in the RA pathway in nephroblastomas [6,7,14]. Overexpression of CRABP2 is related to advanced stages of this cancer, which indicates the involvement of the RA pathway in tumor progression [7,15,16]. CRABP2 protein

expression was found in human fetal kidney samples during the mesenchymal-epithelial transition and in the blastemal component of nephroblastoma; in the latter, it was associated with CRABP2 upregulation [2].

This study aims to evaluate the distribution of RA and CRABP2 protein expression and positivity in nephroblastoma tissue specimens and correlate these results with clinical and pathological prognostic factors.

METHODS

PATIENTS

We selected 77 patients diagnosed with nephroblastoma between 1994 and 2012 who were treated at the pediatric oncology services of the Clinics Hospital Complex/Federal University of Paraná, Pequeno Príncipe Children's Hospital and Erasto Gaertner Hospital. This study was approved by the ethics committees of the three institutions.

The hematoxylin-eosin-stained histological slides were reviewed and classified according to the histological type and presence of anaplasia. Relevant clinical data were obtained such as the gender of patients, age at diagnosis, initial clinical presentation, staging, risk group, presence of metastasis, nodal involvement, treatment received, and clinical evolution.

Twelve tissue microarrays (TMA) containing samples representative of the tumors were constructed. For each case, three distinct tumor areas and one sample of non-tumor renal tissue were selected to compose the TMA.

Information regarding the clinical evolution, initial treatment received (chemotherapy or surgery), and prognostic factors, such as staging, presence of metastasis, histological type, presence of anaplasia, risk group, and nodal involvement, were compiled for statistical analysis and comparison with the immunoexpression of markers in tumor samples.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Histological sections of 4 μ m thickness were obtained for immunohistochemistry. The slides were then subjected to deparaffinization, dehydration, and rehydration. Endogenous peroxidase was blocked using methyl alcohol and hydrogen peroxide for the first block and distilled water and hydrogen peroxide for the second block. The next step was incubation

with the primary antibodies chosen for the study, including rat anti-RA monoclonal antibody (clone 2C9-1F8; 1: 800 dilution, Abcam, Cambridge, MA, USA) and rabbit anti-CRABP2 polyclonal antibody (1:50 dilution, Bioss, Woburn, MA, USA), for one hour in a humid chamber at room temperature. The secondary antibody (Advance™ HRP Dako®, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), conjugated with the polymer dextran, was incubated with the material for 30 minutes, also at room temperature. For the staining, the diaminobenzidine (DAB)+ substrate complex (buffer for DAB dilution) was added to the slides, which were counterstained with Harris hematoxylin, followed by dehydration with 100% ethanol baths and clearing with xylol, analytical grade. The permanent slides were mounted in histological resin for microscopy (Entellan, Merck®). Positive and negative controls were performed in all reactions [17].

EVALUATION OF IMMUNOEXPRESSION

The immunohistochemical expression was evaluated through semiquantitative and quantitative analysis techniques. For the semiquantitative analysis, the Allred scoring system was used, which consists of scores of the proportion and intensity that are summed together to give the total Allred score. The proportion score was calculated as the ratio between positive cells and the total number of cells and was classified as 0 (0%), 1 (>0-1%), 2 (≥1%-10%), 3 (>10%-33%), 4 (>33%-66%), and 5 (>66%-100%). The intensity score was classified as 0 (negative), 1+ (weak), 2+ (moderate), and 3+ (strong). The total score was calculated as the sum of the proportion and intensity scores and ranged from 0 to 8 [18].

The quantitative morphometric analysis was performed using images obtained by a Zeiss Axioscan Slide Scanner (Germany) with 20x magnification, which generates digital Tagged Image File Format (TIFF) files. After scanning, the software generated images in the photomicrograph format, which were analyzed using the image analysis software Image-Pro Plus® (Rockville, MD, USA). The immunostained area of each photomicrograph was measured and is expressed in square micrometers, and the mean was calculated for each case and transformed into the percentage by half-magnification field (HMF) by dividing by the constant 115.226,1 μm^2 and multiplying by 100 for subsequent statistical analysis [19].

STATISTICAL ANALYSIS

For the evaluation of the data obtained, the results of quantitative variables are expressed as the means, medians, minimum values, maximum values, and standard deviations. Qualitative variables are expressed as frequencies and percentages. For comparisons of two groups, the non-parametric Mann-Whitney test was used for quantitative variables. Three or more groups were compared using the non-parametric Kruskal-Wallis test. The normality of the variables was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Values of $p < 0.05$ indicated statistical significance. The data were analyzed using IBM SPSS Statistics v. 20 software.

RESULTS

POPULATION CHARACTERISTICS

Of the total of 77 cases of nephroblastoma selected, the mean age at diagnosis was 33.6 months (0-108 months). The main clinical findings related to the diagnosis were increased abdominal girth in 40.2% ($n=31$), abdominal mass in 37.7% ($n=29$), abdominal pain in 11.7% ($n=9$), fever in 10.4% ($n=8$), vomiting in 3.9% ($n=3$), and weight loss in 3.9% ($n=3$) of the patients. As an initial treatment, 67.1% of the patients underwent pre-surgical chemotherapy, while 25% underwent surgery. Clinical and demographic data are summarized in Table 1.

Table 1. Patients baseline and median immunoexpression values of RA and CRABP2 in nephroblastomas for histological subtype

Variable	Value	Allred score, median		Semiquantitative analysis (%), median	
		RA	CRABP2	RA	CRABP2
Gender (female:male)	31:46				
Age (months), median	33.6				
Metastases, n (%)					
Yes	17 (22.4)				
No	59 (77.6)*				
Histological risk group, n (%)					
High risk	9 (11.7)				
Intermediate risk	68 (88.3)				
Lymph nodes, n (%)					
Negative	36 (46.8)				
Positive	4 (5.2)**				
Local stadium, n (%)					
I	47 (64.4)				
II	13 (17.8)				
III	13 (17.8)***				
Histological classification, n (%)					
Nephroblastoma - epithelial type	10 (13.0)	6	5	24.6	27.6
Nephroblastoma - stromal type	9 (11.7)	5	5	24.1	28.4
Nephroblastoma - mixed type	37 (48.1)	6	5	23.6	27.3
Nephroblastoma - regressive type	4 (5.2)	6	5	25	27.6
Nephroblastoma - blastemal type	12 (15.6)	6	5	24.9	27.5
Nephroblastoma - diffuse anaplasia type	5 (6.5)	6	4.5	21.3	24.7
Clinical evolution, n (%)					
Disease free	57 (74.0)				
Death	11 (14.3)***				

* data cannot be retrieved; ** remaining patients did not undergo lymph node resection; *** specimens with impaired staging; **** patients lost to follow-up or transferred to another center during the study.

IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS

Immunopositivity for RA and CRABP2 was observed in the three histological components of nephroblastoma (blastema, stroma, and epithelium) in both the cytoplasm and nucleus of cancer cells of 93.3% and 43.2% of the samples, respectively. Cytoplasmic and nuclear positivity for CRABP2 were present in 100% and 56% of the samples, respectively. A total of 94.7% of the cases were positive for RA in both the nucleus and the cytoplasm. The total Allred score ranged from 3 to 7 for both markers, with a median of 6 for RA and 5 for CRABP2 (Figure 1).

The results obtained by quantitative analysis of RA and CRABP2 in the nephroblastoma samples showed median values of 24.2% per HMF (6.3%-40.3%) and 26.3% per HMF (4.2%-40.4%), respectively (Table 1).

The immunoexpression of RA and CRABP2 was also observed in samples from the renal parenchyma. Glomeruli and renal tubules expressed RA and CRABP2 both in the nucleus and cytoplasm. The medians of the total Allred score obtained for these samples were 6 for RA and 5 for CRABP2 (Figure 1).

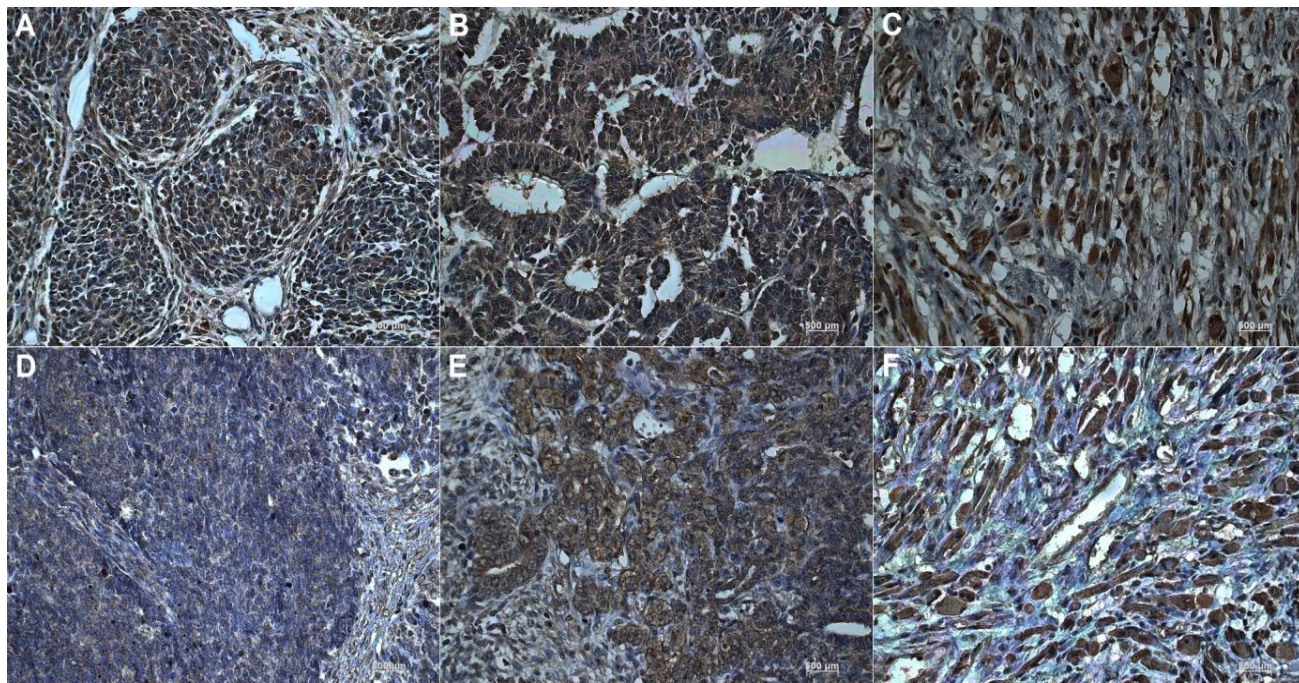


Figure 1. Immunohistochemical expression of RA and CRABP2 in nephroblastoma samples. RA immunoexpression: A, blastema; B, epithelium; C, stroma; CRABP2 immunoexpression: D, blastema; E, epithelium; F, stroma (20x).

PROGNOSTIC IMPORTANCE

The results obtained through quantitative and semiquantitative analyses were compared to clinical and pathological prognostic factors such as histological type, staging, risk group, presence of metastasis, anaplasia, clinical evolution, nodal involvement, and pre-surgical chemotherapy.

According the morphometric analysis, the protein expression of RA was increased in patients with metastasis ($p=0.0247$) and in those who underwent pre-surgical chemotherapy ($p=0.0330$) (Figure 2).

The total Allred scores for CRABP2 were increased in patients with metastasis ($p=0.0128$) (Figure 2).

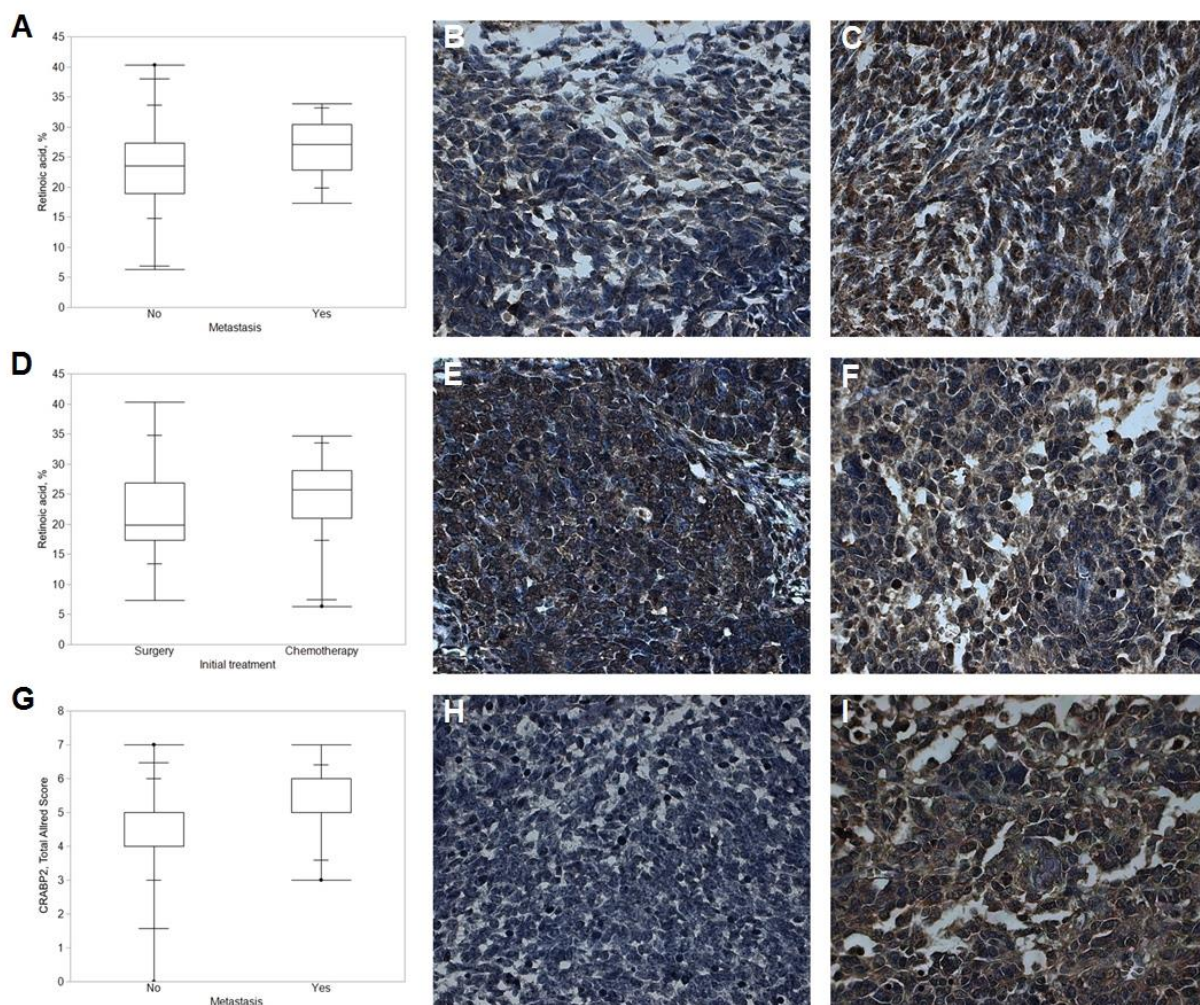


Figure 2. A, Quantitative analysis of RA immunoexpression as a function of the presence of metastasis. The box-plot shows the quantitative analysis of RA immunoexpression according to the presence of metastasis, which represents RA immunoexpression in nephroblastomas with and without metastasis. Increased immunopositivity was observed in patients with metastasis ($p= 0.0247$). B and C, Immunohistochemical expression of RA in nephroblastoma without (B) and with metastasis (C) (63x). D, Quantitative analysis of RA immunoexpression as a function of the initial treatment. The box-plot shows the quantitative analysis of RA immunoexpression according to the type of initial treatment, which represents RA immunoexpression in samples of nephroblastomas from patients subjected to pre-surgical chemotherapy and those who underwent surgery as initial treatment ($p= 0.0330$). E and F, Immunohistochemical expression of RA in nephroblastoma submitted to surgery (E) and pre-surgical chemotherapy (F) (63x). G, Semiquantitative analysis of CRABP2 immunoexpression as a function of the presence of metastasis. The box-plot shows the quantitative analysis of CRABP2 immunoexpression according to the presence of metastasis, which represents CRABP2 immunoexpression in nephroblastomas with and without metastasis. Increased immunopositivity was observed in patients with metastasis ($p= 0.0128$). H and I, Immunohistochemical expression of CRABP2 in nephroblastoma without (H) and with metastasis (I) (63x).

No significant correlation was found between RA and CRABP2 immunopositivity and the clinical evolution, staging, anaplasia, nodal involvement, risk group, and histological type ($p>0.05$).

DISCUSSION

The present work is the first report of the evaluation of immunoexpression of RA and CRABP2 as potential biomarkers and therapeutic targets in tissue samples of nephroblastomas.

The essential functions of RA in biological processes, such as differentiation, proliferation, and apoptosis, have prompted the evaluation of this protein, which was not previously reported in nephroblastomas [8]. The actions of RA depend on intracellular proteins, such as CRABP2, that maintain an adequate RA metabolism by increasing its availability and transporting it to the nucleus [10,13,20].

Upregulation of CRABP2 has been reported in the blastema of nephroblastomas when investigating genes related to nephrogenesis. Nuclear negativity of CRABP2 has been described in 5.31% and cytoplasmic negativity in 6.48% of blastema samples [2]. However, in the samples studied here, which incorporate the three histological components of nephroblastoma (blastema, epithelium, and stroma), we observed cytoplasmic and nuclear positivity in 100% and 56% of the samples, respectively. The immunoexpression of RA and CRABP2 was not restricted to a specific histological type or histological component. Areas of rhabdomyoblastic differentiation and anaplastic nephroblastomas expressed both markers.

Gupta *et al.* described the overexpression of CRABP2 in nephroblastoma samples with favorable histology, with greater expression in advanced cancer stages (stage III/IV). The findings of these authors indicate the role of CRABP2 in cell migration and invasion in nephroblastomas [16]. When comparing the clinical-pathological prognostic factors to the values obtained in the quantitative and semiquantitative analyses, we observed greater expression of RA and CRABP2 in patients with metastasis.

Among our samples, protein expression of RA was increased in samples from patients undergoing pre-surgical chemotherapy. Increased expression of genes of the RA pathway has been described by other authors in nephroblastomas treated with pre-surgical chemotherapy compared to those of patients undergoing surgery as the initial treatment [7]. This phenomenon may be associated with tissue damage and the inflammatory process caused by chemotherapy, which induce increased expression of the RA signaling pathway [21].

In summary, the immunoexpression of RA and CRABP2 was increased in samples from patients with metastatic disease and those subjected to pre-surgical chemotherapy.

CONCLUSIONS

In conclusion, the semiquantitative and quantitative analysis of the RA and CRABP2 markers indicates a role of these proteins as potential biomarkers of tumor progression and their participation in nephroblastoma tumorigenesis. Complementary studies are needed to better understand the mechanisms involved.

LIST OF ABBREVIATIONS

CRABP2 – cellular retinoic acid binding protein 2

DAB – diaminobenzidine

HMF - half-magnification field

RA – retinoic acid

TIFF – tagged image file format

TMA – tissue microarrays

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The research ethics committees of the three participating institutions approved this study, under opinion numbers 308.931, 346.763, and 342.729 of the research ethics committees of the Federal University of Paraná - Health Sciences Sector, César Pernetta Children's Hospital, and Pequeno Príncipe Children's Hospital and Erasto Gaertner Hospital, respectively. No consent to participate was needed.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING

The immunohistochemical analyses were performed in the Laboratory of Experimental Pathology of the Pontifical Catholic University of Paraná.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

APP and LN developed the project. APP selected the samples and reviewed the slides. GLM, SN and APP performed the immunohistochemical analysis. SN performed the slide scanning and digital documentation of immunohistochemical reactions. ESG, APK and SOI provided patient's data. APP performed the statistical analysis. APP and LN wrote the article. All authors have read and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the pathology services of the Clinics Hospital Complex, the Pequeno Príncipe Children's Hospital, and the Erasto Gaertner Hospital for allowing this work to be conducted and the Laboratory of Experimental Pathology of the Pontifical Catholic University of Paraná for the immunohistochemical analysis and image scanning.

AUTHORS' INFORMATION

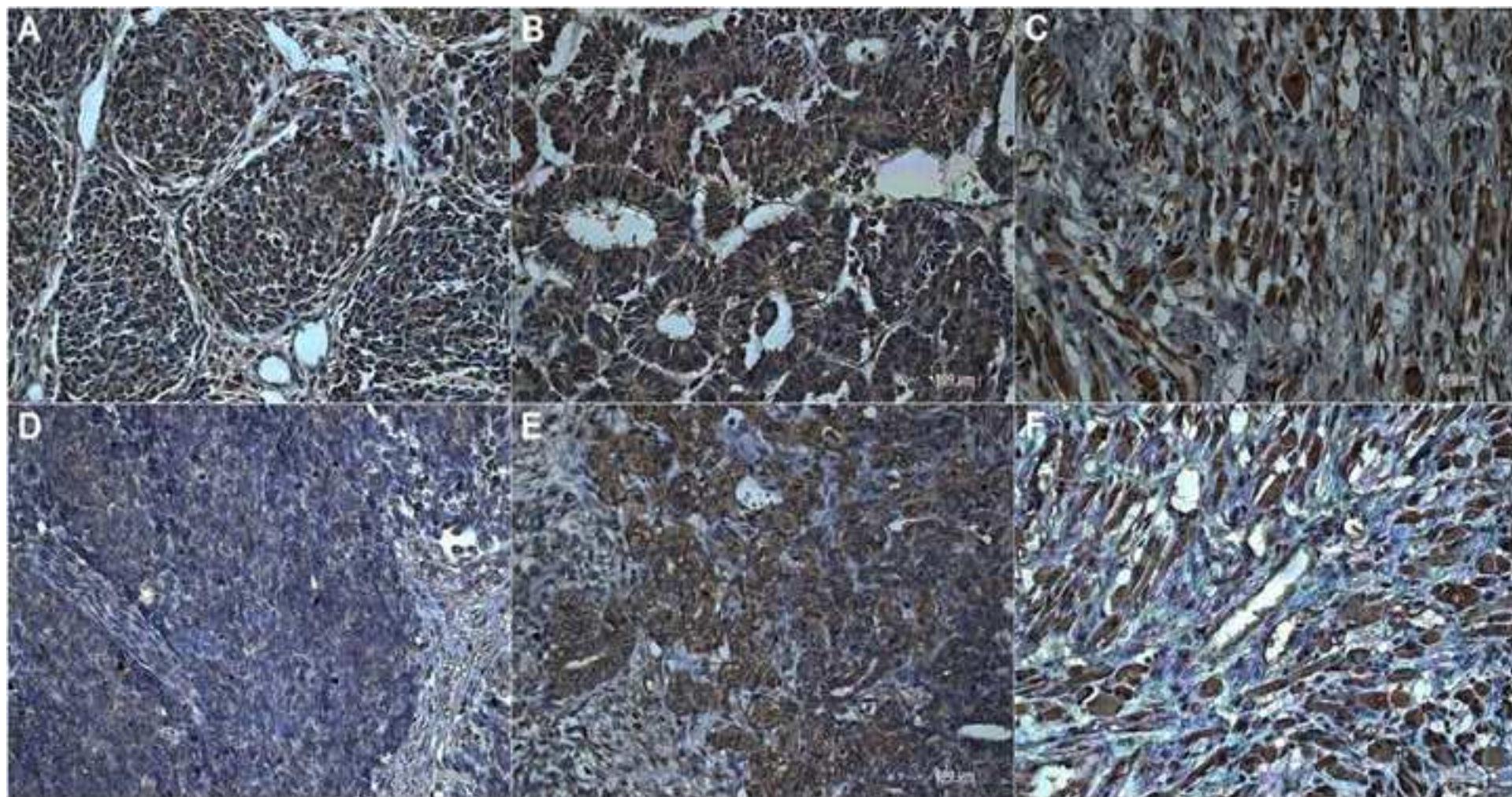
This section is optional.

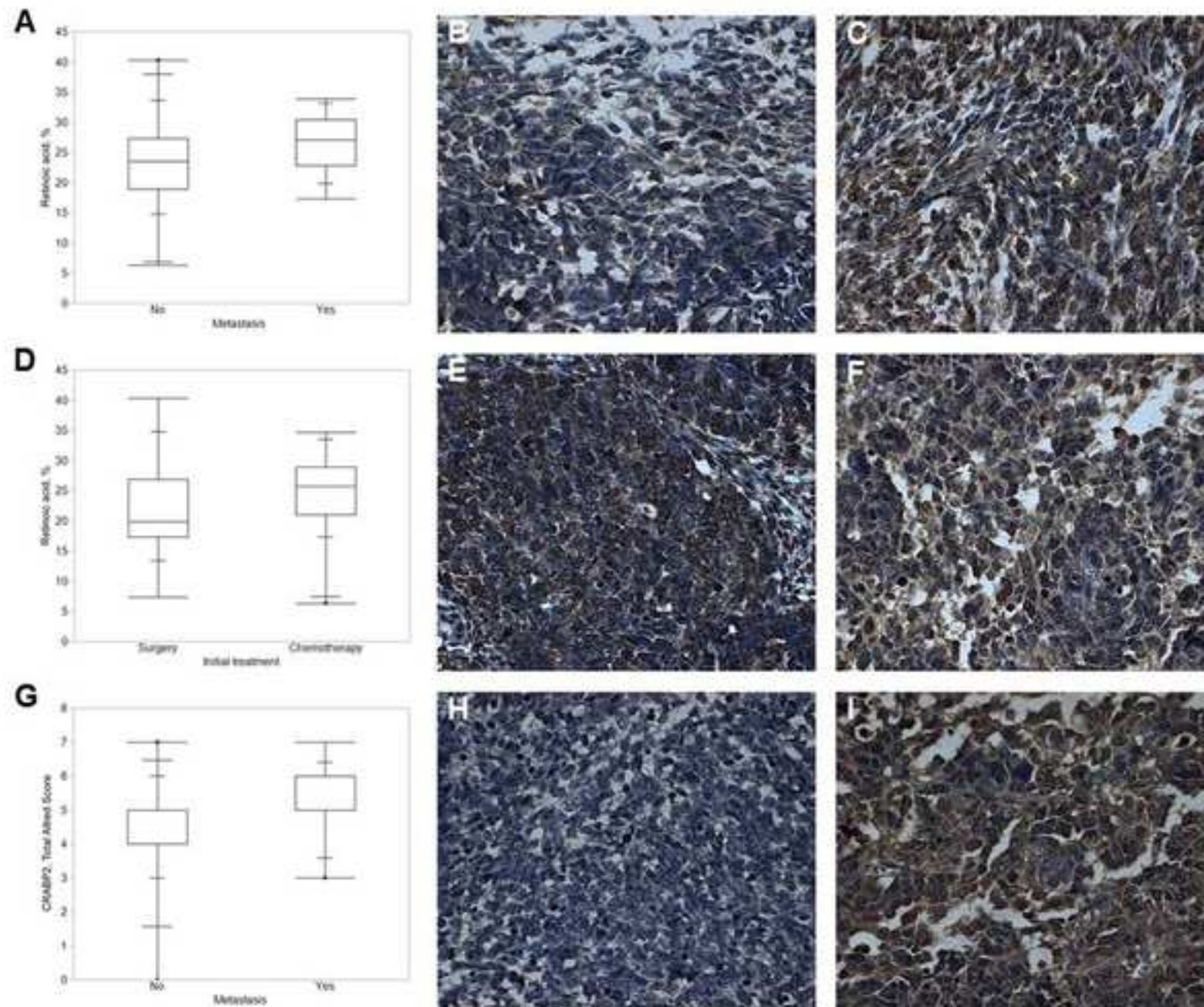
References

1. STILLER CA, PARKIN DM. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull.* 1996;52(4);682-703.
2. MASCHIETTO M, TRAPÉ AP, PICCOLI FS, RICCA TI, DIAS AAM, COUDRY RA, GALANTE PA, TORRES C, FAHHAN L, LOURENÇO S, GRUNDY PE, CAMARGO B, SOUZA S, NEVES EJ, SOARES FA, BRENTANI H, CARRARO DM. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. *Cell Death Dis.* 2011;2:e224.
3. PRITCHARD-JONES K, MOROZ V, VUJANIC G, POWIS M, WALKER J, MESSAHEL B, HOBSON R, LEVITT G, KELSEY A, MITCHELL C. Treatment and outcome of Wilms' tumour patients: an analysis of all cases registered in the UKW3 trial. *Ann Oncol.* 2012;23(9);2457-63.
4. HONEYMAN JN, RICH BS, MCEVOY MP, KNOWLES MA, HELLER G, RIACHY E, KOBOS R, SHUKLA N, WOLDEN SL, STEINHERZ PG, LA QUAGLIA, MP. Factors associated with relapse and survival in Wilms tumor: a multivariate analysis. *J Pediatr Surg.* 2012;47(6);1228-33.
5. DOME JS, GRAF N, GELLER JI, FERNANDEZ CV, MULLEN EA, SPREAFICO F, VAN DEN HEUVEL-EIBRINK M, PRITCHARD-JONES, K. Advances in Wilms tumor treatment and Biology: progress through international collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27);2999-3007.
6. ZIRN B, HARTMANN O, SAMANS B, KRAUSE M, WITTMANN S, MERTENS F, GRAF N, EILERS M, GESSLER M. Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. *Int J Cancer.* 2006;118(8):1954-62.
7. WEGERT J, BAUSENWEIN S, KNEITZ S, ROTH S, GRAF N, GEISSNGER E, GESSLER M. Retinoic acid pathway activity in Wilms tumors and characterization of biological responses in vitro. *Mol Cancer.* 2011;10;136.
8. THEODOSIOU M, LAUDET V, SCHUBERT M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(9); 1423-45.
9. PASSERI D, DOLDO E, TARQUINI C, COSTANZA G, MAZZAGLIA D, AGOSTINELLI S, CAMPIONE E, DI STEFANI A, GIUNTA A, BIANCHI L, ORLANDI A. Loss of CRABP-II characterizes human skin poorly differentiated squamous cell carcinomas and favors DMBA/TPA-induced carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2016;136(6);1255-66.
10. GUPTA S, PRAMANIK D, MUKHERJEE R, CAMPBELL NR, ELUMALAI S, WILDE RF, HONG S, GOGGINS MG, JESUS-ACOSTA A, LAHERU D, MAITRA A. Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18(1);280-9.
11. BUSHUE N, WAN YY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13);1285-98.
12. FAVORSKAYA I, KAINOV Y, CHEMERIS G, KOMELKOV A, ZBOROVSKAYA I, TCHEVKINA E. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(10);10295-300.

- 1 13. BLOMHOFF R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev.* 1994;52; S13-23.
- 2 14. LI W, KESSLER P, WILLIAMS BRG. Transcript profiling of Wilms tumors reveals
- 3 connections to kidney morphogenesis and expression patterns associated with
- 4 anaplasia. *Oncogene.* 2005;24(3):457-68.
- 5 15. ZIRN B, SAMANS B, SPANGENBERG C, GRAF N, EILERS M, GESSLER M. All-
- 6 trans retinoic acid treatment of Wilms tumor cells reverses expression of genes
- 7 associated with high risk and relapse in vivo. *Oncogene.* 2005;24(3); 5246-51.
- 8 16. GUPTA A, KESSLER P, RAWWAS J, WILLIAMS BRG. Regulation of CRABP-II
- 9 expression by MycN in Wilms tumor. *Exp Cell Res.* 2008;314(20);3663-68.
- 10 17. CHONG DC, RABONI SM, ABUJAMRA KB, MARANI DM, NOGUEIRA MB,
- 11 TSUCHIYA LRV, NETO HJC, FLIZIKOWSKI FBZ, NORONHA L. Respiratory viruses
- 12 in pediatric necropsies: an immunohistochemical study. *Pediatr Dev Pathol.* 2009;
- 13 12(3); 211-16.
- 14 18. HARVEY J, CLARK G, OSBORNE C, ALLRED D. Estrogen receptor status by
- 15 immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response
- 16 to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(5);1474-81.
- 17 19. SIMÕES MA, PABIS FC, FREITAS AKE, AZEVEDO MLVA, RONCHI DCM.
- 18 Immunoexpression of GADD45 β in the myocardium of newborns experiencing
- 19 perinatal hypoxia. *Pathol Res Pract.* 2017; 213(3);222-26.
- 20 20. NOY N. Retinoid-binding proteins: mediator of retinoid action. *The Biochem J.*
- 21 2000;348;481-95.
- 22 21. LIEBLER S, ÜBERSCHÄR B, KÜBERT H, BREMS S, SCHNITGER A, TSUKADA M,
- 23 ZOUBOULIS CC, RITZ E, WAGNER J. The renal retinoid system: time-dependent
- 24 activation in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.*
- 25 2004;286(3):F458-65.
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

Variable	Value	Allred score, median		Semi quantitative analysis (%), median	
		RA	CRABP2	RA	CRABP2
Gender (female:male)	31:46				
Age (months), median	33.6				
Metastases, n (%)					
Yes	17 (22.4)				
No	59 (77.6)*				
Histological risk group, n (%)					
High risk	9 (11.7)				
Intermediate risk	68 (88.3)				
Lymph nodes, n (%)					
Negative	36 (46.8)				
Positive	4 (5.2)**				
Local stadium, n (%)					
I	47 (64.4)				
II	13 (17.8)				
III	13 (17.8)***				
Histological classification, n (%)					
Nephroblastoma - epithelial type	10 (13.0)	6	5	24.6	27.6
Nephroblastoma - stromal type	9 (11.7)	5	5	24.1	28.4
Nephroblastoma - mixed type	37 (48.1)	6	5	23.6	27.3
Nephroblastoma - regressive type	4 (5.2)	6	5	25	27.6
Nephroblastoma - blastemal type	12 (15.6)	6	5	24.9	27.5
Nephroblastoma - diffuse anaplasia type	5 (6.5)	6	4.5	21.3	24.7
Clinical evolution, n (%)					
Disease free	57 (74.0)				
Death	11 (14.3)***				





5 CONCLUSÃO

1. Os três componentes histológicos do nefroblastoma (blastema, epitélio e estroma) imunoexpressaram AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK.
2. A imunoexpressão de AR, CRABP2, NFκB p100/52 e NFκB p105/50 foi encontrada no núcleo e citoplasma das células cancerosas do nefroblastoma. A imunoexpressão de TRAP1 e TWEAK foi encontrada no citoplasma das células cancerosas do nefroblastoma.
- 3.a A imunoexpressão de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com o escore total de Allred não se associou com a evolução clínica dos pacientes.
- 3.b A imunoexpressão de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com o escore total de Allred não se associou com o estadiamento.
- 3.c A imunoexpressão de NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com o escore total de Allred apresentou significância estatística com relação ao tipo histológico, sendo que nefroblastomas blastematosos apresentaram menor escore total de Allred quando comparados aos demais tipos histológicos ($p = 0,046$, $p = 0,003$ e $p = 0,026$, respectivamente).
- 3.d A imunoexpressão de CRABP2 de acordo com o escore total de Allred apresentou significância estatística com relação à presença de metástase, sendo mais positiva em pacientes com doença metastática ($p = 0,012$).
- 3.e A imunoexpressão de TRAP1 de acordo com o escore total de Allred apresentou significância estatística com relação à presença de anaplasia, sendo mais positiva em nefroblastomas com anaplasia ($p = 0,005$).
- 3.f A imunoexpressão de TRAP1 de acordo com o escore total de Allred apresentou significância estatística com relação ao grupo de risco, sendo mais positiva em nefroblastomas de alto risco ($p = 0,015$).
- 3.g A imunoexpressão de AR, CRABP2, NFκB p100/52, NFκB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com o escore total de Allred não se associou com o comprometimento nodal.

- 3.h A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com o escore total de Allred não se associou com o tratamento inicial.
- 4.a A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com a análise morfométrica não se associou com a evolução clínica dos pacientes.
- 4.b A imunexpressão de NFkB p105/50 de acordo com a análise morfométrica apresentou significância estatística com relação ao estadio, sendo mais positiva nos estadios I e II quando comparados ao estadio III ($p= 0,041$).
- 4.c A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com a análise morfométrica não se associou com os tipos histológicos de nefroblastoma.
- 4.d A imunexpressão de AR e TWEAK de acordo com a análise morfométrica apresentou significância estatística com relação à presença de metástase, sendo mais expressa em nefroblastomas com metástase ($p= 0,024$ e $p= 0,004$, respectivamente).
- 4.e A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com a análise morfométrica não se associou com a presença de anaplasia.
- 4.f A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com a análise morfométrica não se associou com os grupos de risco do nefroblastoma.
- 4.g A imunexpressão de AR, CRABP2, NFkB p100/52, NFkB p105/50, TRAP1 e TWEAK de acordo com a análise morfométrica não se associou com o comprometimento nodal.
- 4.h A imunexpressão de AR de acordo com a análise morfométrica apresentou significância estatística com relação ao tratamento inicial, sendo maior em nefroblastomas submetidos à quimioterapia pré-cirúrgica ($p= 0,033$). A imunexpressão de TRAP1 de acordo com a análise morfométrica apresentou significância estatística com relação ao tratamento inicial, sendo maior em nefroblastomas submetidos primeiro a cirurgia ($p= 0,036$).

REFERÊNCIAS

ALTIERI, D. C.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; LANGUINO, L. R. TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 3, p. 767-773, 2012.

AMOROSO, M. R.; MATASSA, D. S.; LAUDIERO, G.; EGOROVA, A. V.; POLISHCHUK, R. S.; MADDALENA, F.; PISCASSI, A.; PALADINO, S.; SARNATARO, D.; GARBI, C.; LANCRISCINA, M.; ESPOSITO, F. TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 4, p. 592-604, 2012.

AMOROSO, N. R.; MATASSA, D. S.; SISINNI, L.; LETTINI, G.; LANDRISCINA M.; ESPOSITO, F. TRAP1 revisited: novel localizations and functions of a 'next-generation' biomarker (Review). **International Journal of Oncology**, v. 45, n. 3, p. 969-977, 2014.

BALDWIN, A. S. The NF- κ B and I κ B proteins: new Discoveries and insights. **Annual Review of Immunology**, v. 14, p. 649-681, 1996.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-545, 2001.

BECKWITH, J. B.; PALMER, N. F. Histopathology and prognosis of Wilms tumor. Results from the First National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 41, n. 5, p. 1937-1948, 1978.

BECKWITH, J. B. Wilms' tumor and other renal tumors of childhood: a selective review from the National Wilms' Tumor Study pathology center. **Human Pathology**, v. 14, n. 6, p. 481-492, 1983.

BECKWITH, J. B.; ZUPPAN, C. E.; BROWNING, N. G.; MOKSNESS, J.; BRESLOW, N. E. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 27, n. 5, p. 422-428, 1996.

BECKWITH, J. B. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. **American Journal of Medical Genetics**, v. 79, n. 4, p. 268-273, 1998.

BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 715-723, 2011.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate end points: preferred definitions and conceptual framework. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, n. 3, p. 89-95, 2001.

BLOMHOFF, R. Transport and metabolism of vitamin A. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 2, p. S13-S23, 1994.

BOCCON-GIBOD, L. A. Pathological evaluation of renal tumors in children: International Society of Pediatric Oncology approach. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 1, n. 3, p. 243-248, 1998.

BOCCON-GIBOD, L.; REY, A.; SANDSTEDT, B.; DELEMARRE, J.; HARMS, D.; VUJANIĆ, G.; DE KRAKER, J.; WEIRICH, A.; TOURNADE, M. F. Complete necrosis induced by preoperative chemotherapy in Wilms tumor as an indicator of low risk: report of the international Society of Paediatric Oncology (SIOP) Nephroblastoma Trial and Study 9. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 34, n. 4, p. 183-190, 2000.

BODMER, J. L.; SCHNEIDER, P.; TSCHOPP, J. The molecular architecture of the TNF superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 2002.

BONADIO, J. F.; STORER, B.; NORKOOL, P.; FAREWELL, V. T.; BECKWITH, J. B.; D'ANGIO, G. J. Anaplastic Wilms' tumor: clinical and pathologic studies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 4, p. 513-520, 1985.

BRANDTZAEGU, P. The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. **Journal of Immunological Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 49-67, 1998.

BRESLOW, N. E.; PALMER, N. F.; HILL, L. R.; BURING, J.; D'ANGIO, G. J. Wilms' tumor: prognostic factors for patients without metastases at diagnosis. Results of the National Wilms' Tumor Study. **Cancer**, v. 41, n. 4, p. 1577-1589, 1978.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of the National Wilms' Tumor Study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 68, n. 3, p. 429-436, 1982.

BRESLOW, N. E.; CHURCHILL, G.; BECKWITH, J. B.; FERNBACH, D. J.; OTHERSON, H. B.; TEFFT, M.; D'ANGIO, G. J. Prognosis for Wilms' tumor patients with nonmetastatic disease at diagnosis – results of the Second National Wilms' tumor Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, n. 4, p. 521-531, 1985.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; CIOL, M.; SHARPLES, K. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' tumor Study. **Cancer Research**, v. 48, n. 6, p. 1653-1657, 1988.

BRESLOW, N. E.; SHARPLES, K.; BECKWITH, J. B.; TAKASHIMA, J.; KELALIS, P. P.; GREEN, D. M.; D'ANGIO, G. J. Prognostic factors in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor. **Cancer**, v. 68, n. 11, p. 2345-2353, 1991.

BRESLOW, N.; OLSHAN, A.; BECKWITH, J. B.; GREEN, D. Epidemiology of Wilms tumor. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 21, n. 3, p. 172-181, 1993.

BRESLOW, N. E.; OLSHAN, A.; BECKWITH, J. B.; MOKSNESS, J.; FEIGL, P.; GREEN, D. Ethnic variation in the incidence, diagnosis, prognosis, and follow-up of children with Wilms' tumor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 1, p. 49-51, 1994.

BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; PERLMAN, E. J.; REEVE, A. E. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. **Pediatric blood & cancer**, v. 47; n. 3, p. 260-267, 2006.

BUSHUE, N.; WAN, Y. Y. Retinoid pathway and câncer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 13, 1285-1298, 2010.

CALMON, M. F.; RODRIGUES, R. V.; KANETO, C. M.; MOURA, R. P.; SILVA, S. D.; MOTA, D. C.; PINHEIRO, D. G.; TORRES, C.; CARVALHO, A. F.; CURY, P. M.; NUNES, F. D.; NISHIMOTO, I. N.; SOARES, F. A.; SILVA, A. M. A.; KOWALSKI, L. P.; BRENTANI, H.; ZANELLI, C. F.; SILVA JR, W. A.; RAHAL, P.; TAJARA, E. H.; CARRARO, D. M.; CAMARGO, A. A.; VALENTINI, S. R. Epigenetic silencing of CRABP2 and MX1 in head and neck tumors. **Neoplasia**, v. 11, n. 12, p. 1329-1339, 2009.

CAPRA, M. L.; WALKER, D. A.; MOHAMMED, W. M.; KAPILA, L.; BARBOR, P. R.; SOKAL, M.; ROBSON, K.; HEWITT, M.; STEWART, R. Wilms' tumor: a 25 – year review of the role of preoperative chemotherapy. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 34, n. 4, p. 579-582, 1999.

CARVAJAL-HAUSDORF, D. E.; SCHALPER, K. A.; NEUMEISTER, V. M.; RIMM, D. L. Quantitative measurement of cancer tissue biomarkers in the lab and in the clinic. **Laboratory Investigation**, v. 95, n. 4, p. 385-396, 2015.

CASSADY, J. R.; TEFFT, M.; FILLER, R. M.; JAFFE, N.; PAED, D.; HELLMA, N. S. Considerations in the radiation therapy of Wilms' tumor. **Cancer**, v. 32, n. 3, p. 598-608, 1973.

CHEN, C. F.; CHEN, Y.; DAI, K.; CHEN, P. L.; RILEY, D. J.; LEE, W. H.. A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4691-4699, 1996.

CHICHEPORTICHE, Y.; BOURDON, P. R.; XU, H.; HSU, Y. M.; SCOTT, H.; HESSION, C.; GARCIA, I.; BROWNING, J. L. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32401-32410, 1997.

COSTANTINO, E.; MADDALENA, F.; CALISE, S.; PISCAZZI, A.; TIRINO, V.; FERSINI, A.; AMBROSI, A.; NERI, V.; ESPOSITO, F.; LANDRISCINA, M. TRAP1, a novel mitochondrial chaperone responsible for multi-drug resistance and protection from apoptosis in human colorectal carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 279, n. 1, p. 39-46, 2009.

COTTON, C. A.; PETERSON, S.; NORKOOL, P. A.; TAKASHIMA, J.; GRIGORIEV, Y.; BRESLOW, N. E. Early and late mortality after diagnosis of Wilms tumor. **Journal of Clinica Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1304-1309, 2009.

DE CAMARGO, B.; FRANCO, E. L. A randomized clinical trial of single-dose versus fractionated-dose dactinomycin in the treatment of Wilms' tumor. Results after

extended follow-up. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Cancer**, v. 73, n. 12, p. 3081-3086, 1994.

DEHBI, M.; HISCOTT, J.; PELLETIER, J. Activation of the WT1 Wilms' tumor suppressor gene by NF- κ B. **Oncogene**, v. 16, n. 16, p. 2033-2039, 1998.

DE KRAKER, J.; DELEMARRE, J. F. M.; LILIEN, M. R.; TOURNADE, M. F. Misstaging in nephroblastoma. Causes and consequences. A report of the sixth nephroblastoma trial and study of the International Society of Paediatric Oncology. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 9, n. 3, p. 153-157, 1999.

DOME, J. S.; COPPES, M. J. Recent advances in Wilms tumor genetics. **Current opinion in pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 5-11, 2002.

DOME, J. S.; PERLMAN, E. J.; GRAF, N. Risk stratification for Wilms tumor: current approach and future directions. **American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting**, p. 215-223, 2014.

DOME, J. S.; GRAF, N.; GELLER, J. I.; FERNANDEZ, C. V.; MULLEN, E. A.; SPREAFICO, F.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M.; PRITCHARD-JONSE, K. Advances in Wilms tumor treatment and Biology: progress through international collaboration. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 27, p. 2999-3007, 2015.

DUMOUCEL, S.; GAUTHIER-VILLARS, M.; STOPPA-LYONNET, D.; PARISOT, P.; BRISSE, H.; PHILIPPE-CHOMETTE, P.; SARNACKI, S.; BOCCON-GIBOD, L.; ROSSIGNOL, S.; BAUMANN, C.; AERTS, I.; BOURDEAUT, F.; DOZ, F.; ORBACH, D.; PACQUEMENT, H.; MICHON, J.; SCHELEIERMACHER, G. Malformations, genetic abnormalities, and Wilms Tumor. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61; n. 1, p. 140-144, 2014.

DUNSTAN, R. W.; JR WHARTON, K. A.; QUIGLEY, C.; LOWE, A. The use of immunohistochemistry for biomarker assessment – can it compete with other Technologies? **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 6, p. 988-1002, 2011.

EHRlich, P. F.; HAMILTON, T. E.; GRUNDY, P. E.; RITCHEY, M.; HAASE, G.; SHAMBERGER, R. C. The value of surgery in directing therapy for patients with Wilms' tumor with pulmonary disease. A report from the National Wilms' tumor Study Group (National Wilms' tumor Study 5). **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 1, p. 162-167, 2006.

EHRlich, P. F.; FERRER, F. A.; RITCHEY, M. L.; ANDERSON, J. R.; GREEN, D. M.; GRUNDY, P. E.; DOME, S.; KALAPURAKAL, J. A.; PERLMAN, E. J.; SHAMBERGER, R. C. Hepatic metastasis at diagnosis in patient with Wilms tumor is not an independent adverse prognostic factor for stage IV Wilms tumor. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 4, p. 642-648, 2009.

FARIA, P.; BECKWITH, J. B.; MISHRA, K.; ZUPPAN, C.; WEEKS, D. A.; BRESLOW, N.; GREEN, D. M. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor – new definitions

with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 20, n. 8, p. 909-920, 1996.

FAVORSKAYA, I.; KAINOV, Y.; CHEMERIS, G.; KOMELKOV, A.; ZBOROVSKAYA, I.; TCHEVKINA, E. Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer. **Tumour Biology**, v. 35, n. 10, 10295-10300, 2014.

FRANCO, E. L.; DE CAMARGO, B.; SABA, L.; MARQUES, L. A. Epidemiological and clinical correlations with genetic characteristics of Wilms' tumor: results of the brazilian Wilms' tumor study group. **International Journal of Cancer**, v. 48, n. 5, p. 641-646, 1991.

FU, Y.S.; WANG, Q.; MA, J.X.; YANG, X.H.; WU, M.L.; ZHANG, K.L.; KONG, Q.Y.; CHEN, X.Y.; SUN, Y.; CHEN, N.N.; SHU, X.H.; LI, H.; LIU, J. CRABP-II methylation: a critical determinant of retinoic acid resistance of meduloblastoma cells. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 1, p. 48-61, 2012.

FUKUZAWA, R.; HEATHCOTI, R. W.; SANO, M.; MORISON, I. M.; YUN, K.; REEVE, A. E. Myogenesis in Wilms' tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 7, n. 2, p. 125-137, 2004.

GREEN, D. M.; BECKWITH, J. B.; WEEKS, D. A.; MOKSNESS, J.; BRESLOW, N. E.; D'ANGIO, G. J. The relationship between microsubstaging variables, age at diagnosis, and tumor weight of children with stage I/favorable histology Wilms' tumor. A report from the National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 74, n. 6, p. 1817-1820, 1994.

GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E.; EVANS, I.; MOKSNESS, J.; D'ANGIO, G. J. Treatment of children with stage IV favorable histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 26, n. 3, p. 147-152, 1996.

GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E.; BECKWITH, J. B.; RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; D'ANGIO, G. J.; PERLMAN, E.; DONALDSON, M.; GRUNDY, P. E.; WEETMAN, R.; COPPES, M. J.; MALOGOLOWKIN, M.; SHEARER, P.; COCCIA, P.; KLETZEL, M.; THOMAS, P. R.; MACKLIS, R.; TOMLINSON, G.; HUFF, V.; NEWBURY, R.; WEEKS, D. Treatment with nephrectomy only for small, stage I/favorable histology Wilms' tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 17, p. 3719-3724, 2001.

GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E.; D'ANGIO, G. J.; MALOGOLOWKIN, M. H.; RITCHEY, M. L.; EVANS, A. E.; BECKWITH, J. B.; PERLMAN, E. J.; SHAMBERGER, R. C.; PETERSON, S.; GRUNDY, P. E.; DOME, J. S.; THOMAS, P. R. M.; KALAPURAKAL, J. A. Outcome of patients with stage II/favorable histology Wilms tumor with and without local tumor spill: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 1, p. 134-139, 2014.

GRUNDY, P. E.; BRESLOW, N. E.; LI, S.; PERLMAN, E.; BECKWITH, B.; RITCHEY, M. L.; SHAMBERGER, R. C.; HAASE, G. M.; D'ANGIO, G. J.; DONALDSON, M.; COPPES, M. J.; MALOGOLOWKIN, M.; SHEARER, P.; THOMAS, P. R. M.; MACKLIS, R.; TOMLINSON, G.; HUFF, V.; GREEN, D. M. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is a adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms Tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 29, p. 7312-7321, 2005.

GU, J.; TAYLOR, C. R.; PHIL, D. Practicing pathology in the era of big data and personalized medicine. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2014.

GUPTA, A.; KESSLER, P.; RAWWAS, J.; WILLIAMS, B. R. G. Regulation of CRABP-II expression by MycN in Wilms tumor. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 20, p. 3663-3668, 2008.

GUPTA, S.; PRAMANIK, D.; MUKHERJEE, CAMPBELL, N.R.; ELUMALAI, S.; WILDE, R. F.; HONG, S.; GOGGINS, M. G.; JESUS-ACOSTA, A.; LAHERU, D.; MAITRA, A. Molecular determinants of retinoic acid sensitivity in pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 280-289, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5): 646-674, 2011

HARTLEY, A. L.; BIRCH, J. M.; WALLACE, S. A.; KELSEY, A. M.; HARRIS, M.; JONES, P. H. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 67, n. 2, p. 133-135, 1993.

HATATA, T.; HIGAKI, K.; SHOMORI, K.; IKEGUCHI, M. Immunohistochemical study of nuclear factor- κ B expression in esophageal squamous cell carcinoma: prognostic significance and sensitivity to treatment with 5-FU. **Diseases of the esophagus**, v. 25, n. 8, p. 716-722, 2012.

HIRSCH, B.; SHIMAMURA, A.; MOREAU, L.; BALDINGER, S.; HAG-ALSHIEKH, M.; BOSTROM, B.; SENCER, S.; D'ANDREA, A. D. Association of biallelic BRCA2/FANCD1 mutations with spontaneous instability and solid tumors of childhood. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2554-2559, 2004.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 86, 2013.

HONEYMAN, J.N.; RICH, B.S.; MCEVOY, M.P.; KNOWLES, M.A.; HELLER, G.; RIACHY, E.; KOBOS, R.; SHUKLA, N.; WOLDEN, S.L.; STEINHERZ, P.G.; LA QUAGLIA, M.P. Factors associated with relapse na survival in Wilms tumor: a multivariate analysis. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 47, n. 6, p. 1228-1233, 2012.

HUANG, C.; GADD, S.; BRESLOW, N.; CUTCLIFFE, C.; SREDNI, S. T.; HELENOWSKI, I. B.; DOME, J. S.; GRUNDY, P. E.; GREEN, D. M.; FRITSCH, M. K.; PERLMAN, E. J. Predicting relapse in favorable histology Wilms tumor using gene expression analysis: a report from the Renal Tumor Committee of the

Children's Oncology Group. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 5, p. 1770-1778, 2009.

HUBER, M. A.; AZOITEI, N.; BAUMANN, B.; GRÜNERT, S.; SOMMER, A.; PEHAMBERGER, H.; KRAUT, N.; BEUG, H.; WIRTH, T. NF- κ B is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 4, p. 569-581, 2010.

HUNTER, J. E.; LESLIE, J.; PERKINS, N. D. c-Rel and its many roles in cancer: an old story with new twists. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 1, p. 1-6, 2016.

IM, C. N. Past, present, and emerging roles of mitochondrial heat shock protein TRAP1 in the metabolism and regulation of cancer stem cells. **Cell Stress and Chaperones**, v. 21, n. 4, p. 553-562, 2016.

JAFFER, S.; BLEIWEISS, I. J. Beyond hematoxylin and eosin – the role of immunohistochemistry in surgical pathology. **Cancer Investigation**, v. 22, n. 3, p. 445-465, 2004.

JAKUBOWSKI, A.; BROWNING, B.; LUKASHEV, M.; SIZING, I.; THOMPSON, J. S.; BENJAMIN, C. D.; HSU, Y. M.; AMBROSE, C.; ZHENG, T. S.; BURKLY, L. C. Dual role for TWEAK in angiogenic regulation. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 267-274, 2001.

JEREB, B.; TOURNADE, M. F.; LEMERLE, J.; VOÛTE, P. A.; DELEMARRE, J. F.; AHSTROM, L.; FLAMANT, R.; GÉRARD-MARCHANT, R.; SANDSTEDT, B. Lymph node invasion and prognosis in nephroblastoma. **Cancer**, v. 45, n. 7, p. 1632-1636, 1980.

JIAO, X.; WOOD, L.; LINDMAN, M.; JONES, S.; BUCKHAULTS, P.; POLYAK, K.; SUKUMAR, S.; CARTER, H.; KIM, D.; KARCHIN, R. SJÖBLOM, T. Somatic mutations in the Notch, NF- κ B, PIK3CA, and Hedgehog pathways in human breast cancers. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 51, n. 5, p. 480-489, 2012.

KALAPURAKAL, J. A.; DOME, J. S.; PERLMAN, E. J.; MALOGOLOWKIN, M.; HAASE, G. M.; GRUNDY, P.; COOPES, M. J. Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 1, p. 37-46, 2004.

KANG, B. H.; PLESCIA, J.; DOHI, T.; ROSA, J.; DOXSEY, S. J.; ALTIERI, D. C. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 257-270, 2007.

KANG, B. H. TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-target TRAP1 inhibitors. **BMB reports**, v. 45, n. 1, p. 1-6, 2012.

KARIN, M.; CAO, Y.; GRETEN, F. R.; LI, Z. W. NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 301-310, 2002.

KREPISCHI, A. C. V.; MASCHIETTO, M.; FERREIRA, E. N.; SILVA, A. G.; COSTA, S. S.; CUNHA, I. W. Genomic imbalances pinpoint potential oncogenes and tumor suppressions in Wilms tumors. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, p. 20, 2016.

KUBOTA, K.; INOUE, K.; HASHIMOTO, R.; KUMAMOTO, N.; KOSUGA, A.; TATSUMI, M.; KAMIJIMA, K.; KUNUGI, H.; IWATA, N.; OZAKI, N.; TAKEDA, M.; TAHYAMA, M. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates cell adhesion and synaptic morphology via modulation of N-cadherin expression. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 2, p. 496-508, 2009.

LANDRISCINA, M.; AMOROSO, M. R.; PISCAZZI, A.; ESPOSITO, F. Heat shock proteins, cell survival and drug resistance: the mitochondrial chaperone TRAP1, a potential novel target for ovarian cancer therapy. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2, p. 177-182, 2010.

LANGE, J. M.; TAKASHIMA, J. R.; PERTERSON, S. M.; KALAPURAKAL, M. D.; GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E. Breast cancer in female survivors of Wilms Tumor: a report from the national Wilms Tumor late effects study. **Cancer**, v. 120, n. 23, p. 3722-3730, 2014.

LARSEN, E.; PEREZ-ATAYDE, A.; GREEN, D. M.; RETIK, A.; CLAVELL, L. A.; SALLAN, S. E. Surgery only for the treatment of patients with stage I (Cassady) Wilms' tumor. **Cancer**, v. 66, n. 2, p. 264-266, 1990.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651, 2009.

LEMERLE, J.; TOURNADE, M. F.; MARCHANT, R. G.; FLAMANT, R.; SARRAZIN, D.; FLAMANT, F.; LEMERLE, M.; JUNDT, S.; ZUCKER, J. M.; SCHWEISGUTH, O. Wilms' tumor: natural history and prognostic factors. A retrospective study of 248 cases treated at the Institut Gustave-Roussy 1952-1967. **Cancer**, v. 37, n. 5, p. 2557-2566, 1976.

LEMERLE, J.; VOUTE, P. A.; TOURNADE, M. F.; RODARY, C.; DELEMARRE, J. F. M.; SARRAZIN, D.; BURGERS, J. M. V.; SANDSTEDT, B.; MILDENBERGER, H.; CARLI, M.; JEREB, B.; MOORMAN-VOESTERMANS, C. G. M. Effectiveness of preoperative chemotherapy in Wilms' tumor: results of an International Society of Pediatric Oncology (SIOP) clinical trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 1, n. 10, p. 604-609, 1983.

LEONG, A. S.; WRIGHT, J. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. **Histopathology**, v. 11, n. 12, p. 1295-12305, 1987.

LETTINI, G.; SISINNI, L.; CONDELLI, V.; MATASSA, D. S.; SIMEON, V.; MADDALENA, F.; GEMEI, M.; LOPES, E.; VITA, G.; VECCHIO, L. D.; ESPOSITO, F.; LANDRISCINA, M. TRAP1 regulates stemness through Wnt/ β -catenin pathway in human colorectal carcinoma. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 11, p. 1792-1803, 2016.

LEVIDOU, G.; KORKOLOPOULOU, P.; NIKITEAS, N.; TZANAKIS, N.; THYMARA, I.; SAETTA, A. A.; TSIGRIS, C.; RALLIS, G.; VLASIS, K.; PATSOURIS, E. Expression of nuclear factor κ B in human gastric carcinoma: relationship with I κ B α and prognostic significance. **Virchows Archive**, v. 450, n. 5, p. 519-527, 2007.

LI, S.; LV, Q.; SUN, H.; XUE, Y.; WANG, P.; LIU, L.; LI, Z.; LI, Z.; TIAN, X.; LIU, Y. H. Expression of TRAP1 predicts poor survival of malignant glioma patients. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 55, n. 1, p. 62-68, 2015.

LIBES, J. N.; SEELEY, E. H.; LI, M.; AXT, J. R.; PIERCE, J.; CORREA, H.; NEWTON M.; HANSEN, E.; JUDD, A.; MCDONALD, H.; CAPRIOLI, R. M.; NARANJO, A.; HUFF, V.; O'NEILL, J. A.; LOVVORN, H. N. III. Race disparities in peptide profiles of North American and Kenyan Wilms tumor specimens. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 218, n. 4, p. 707-720, 2014.

LIU, D.; HU, J.; AGORRETA, J.; CESARIO, A.; ZHANG, Y.; HARRIS, A. L. GATTER, K.; PEZZELLA, F. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates genes involved in cell cycle and metastases. **Cancer Letters**, v. 296, n. 2, p. 194-205, 2010.

LIU, R. Z.; LI, S.; GARCIA, E.; GLUBRECHT, D. D.; POON, H. Y.; EASAW, J. C.; GODBOUT, R. Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma. **Glia**, v. 64, n. 6, p. 963-976, 2016.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

MALLIKARJUNA, K.; SUNDARAM, C. S.; SHARMA, Y.; DEEPA, P. R.; KHETAN, V. GOPAL, L.; BISWAS, J.; SHARMA, T.; KRISHNAKUMAR, S. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors. **Proteomics. Clinical Applications**, v. 4, n. 4, p. 449-463, 2010.

MALOGOLOWKIN, M.; SPREAFICO, F.; DOME, J. S.; VAN TINTEREN, H.; PRITCHARD-JONES, K.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; BERGERON, C.; KRAKER, J.; GRAF, N. Incidence and outcomes of patients with late recurrence of Wilms' tumor. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 60, n. 10, p. 1612-1615, 2013.

MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-444, 2008.

MARSTERS, S. A.; SHERIDAN, J. P.; PITTI, R. M.; BRUSH, J.; GODDARD, A.; ASHKENAZI, A. Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. **Current Biology**, v. 8, p. 525-528, 1998.

MARX, M.; LANGER, T.; GRAF, N.; HAUSDORF, G.; STÖHR, W.; LUDWIG, R.; BECK, J. D. Multicentre analysis of anthracycline-induced cardiotoxicity in children following treatment according to the nephroblastoma studies SIOP no. 9/GPOH and SIOP 93-01/GOPH. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 39, n. 1, p. 18-24, 2002.

MASCHIETTO, M.; TRAPÉ, A.P.; PICCOLI, F.S.; RICCA, T.I.; DIAS, A.A.M.; COUDRY, R.A.; GALANTE, P.A.; TORRES, C.; FAHHAN, L.; LOURENÇO, S.; GRUNDY, P.E.; CAMARGO, B.; SOUZA, S.; NEVES, E.J.; SOARES, F.A.; BRENTANI, H.; CARRARO, D.M. Temporal blastemal cell gene expression analysis in the kidney reveals new Wnt and related signaling pathway genes to be essential for Wilms' tumor onset. **Cell Death and Disease**, v. 2, p. e224, 2011.

MASCHIETTO, M.; WILLIAMS, R. D.; CHAGTAI, T.; POPOV, S. D.; SEBIRE, N. J.; VUJANIĆ, G.; PERLMAN, E.; ANDERSON, J. R.; GRUNDY, P.; DOME, J. S.; PRITCHARD-JONES, K. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms Tumour with diffuse anaplasia. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109924, 2014.

MATASSA, D. S.; AMOROSO, M. R.; MADDALENA, F.; LANDRISCINA, M.; ESPOSITO, F. New insights into TRAP1 pathway. **American Journal of cancer research**, v. 2, n. 2, p. 235-248, 2012.

MESSAHEL, B.; WILLIAMS, R.; RIDOLFI, A.; A'HERN, R.; WARREN, W.; TINWORTH, L.; HOBSON, R.; AL-SAAD, R.; WHYMAN, G.; BRUNDLER, M.; KELSEY, A.; SEBIRE, N.; JONES, C.; VUJANIC, G.; PRITCHARD-JONES, K. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: A Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) study. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 5, p. 819-826, 2009.

MÜLLAUER, L. Milestones in pathology – from histology to molecular biology. **Magazine of European Medical Oncology**, v. 10, n. 1, p. 42-45, 2017.

MURPHY, A. J.; AXT, J. R.; DE CAESTECKER, C.; PIERCE, J.; CORREA, H.; SEELEY, E. H.; CAPRIOLI, R. M.; NEWTON, M. W.; DE CAESTECKER, M. P.; LOVVORN, H. N. III. Molecular characterization of Wilms tumor from a resource-constrained region of sub-Saharan Africa. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 6, p. E983-E994, 2012.

NAKAYAMA, M.; ISHIDOH, K.; KAYAGAKI, N.; KOJIMA, Y.; YAMAGUCHI, N.; NAKANO, H.; KOMINAMI, E.; OKUMURA, K.; YAGITA, H. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. **Journal of Immunology**, v. 168, n. 2, p. 734-743, 2002.

NG, A.; GRIFFITHS, A.; COLE, T.; DAVISON, V.; GRIFFTHS, M.; LARKIN, S.; PARKES, S. E.; MANN, J. R.; GRUNDY, R. G. Congenital abnormalities and clinical features associated with Wilms' tumour: a comprehensive study from a centre serving a large population. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 9, p. 1422-1429, 2007.

NICOLIN, G.; TAYLOR, R.; BAUGHAN, C.; SHANNON, R.; STEVENS, S.; RICHARDSON, D.; KELSEY, A.; PRITCHARD-JONES, K.; MITCHELL, C. Outcome after pulmonary radiotherapy in Wilms' tumor patients with pulmonary metastasis at diagnosis: a UK Children's Cancer Study Group, Wilms' tumour Working Group Study. **International Journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 70, n. 1, p. 178-180, 2008.

NOURKAMI, N.; FURWÄNGLER, R.; ALKASSAR, M.; GRAF, N. Secondary neoplasms after Wilms' tumor in Germany. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 185, n. 2, p. 11-12, 2009.

NOY, N. Retinoid-binding proteins: mediator of retinoid action. **The Biochemical Journal**, v. 348, 481-495, 2000.

OKERA, M.; BAE, K.; BERNSTEIN, E.; CHENG, L.; LAWTON, C.; WOLKOV, H.; POLLAK, A.; DICKER, A.; SANDLER, H.; SWEENEY, C. J. Evaluation of nuclear factor κ B and chemokine receptor CXCR4 co-expression in patients with prostate cancer in the radiation therapy oncology group (RTOG) 8610. **BJU International**, v. 108, n. 2B, E51-E58, 2011.

OYA, M.; OHTSUBO, M.; TAKAYANAGI, A.; TACHIBANA, M.; SHIMIZU, N.; MURAI, M. Constitutive activation of nuclear factor- κ B prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells. **Oncogene**, v. 20, n. 29, 3888-3896, 2001.

PASSERI, D.; DOLDO, E.; TARQUINI, C.; COSTANZA, G.; MAZZAGLIA, D.; AGOSTINELLI, S.; CAMPIONE, E.; DI STEFANI, A.; GIUNTA, A.; BIANCHI, L.; ORLANDI, A. Loss of CRABP-II characterizes human skin poorly differentiated squamous cell carcinomas and favors DMBA/TPA-induced carcinogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 6, 1255-1266, 2016.

PASTORE, G.; CARLI, M.; LEMERLE, J.; TOURNADE, M. F.; VOUTE, P. A.; REY, A.; BURGERS, J. M. V.; ZUCKER, J. M.; BURGER, D.; DE KRAKER, J.; DELEMARRE, J. F. M. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). **Medical and Pediatric Oncology**, v. 16, n. 1, p. 7-11, 1988.

PERI, S.; DEVARAJAN, K.; YANG, D. H.; KNUDSON, A. G.; BALACHADRAN, S. Meta-analysis identifies NF- κ B as a therapeutic target in renal cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 10, e76746, 2013.

PRIDGEON, J. W.; OLZMANN, J. A.; CHIN, L. S.; LI, L. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. e172, 2007.

PRITCHARD-JONES, K.; KELSEY, A.; VUJANIĆ, G.; IMESON, J.; HUTTON, C.; MITCHELL, C. Older age is an adverse prognostic factor in stage I, favorable histology Wilms' tumor treated with vincristine monochemotherapy: a study by the United Kingdom Children's Cancer Study Group, Wilms' tumor Working Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 17, p. 3269-3275, 2003.

RAMASAMY, A. Increasing statistical Power and generalizability in genomics microarray research. **University of Oxford**, 2010.

RAPLEY, E. A.; BONAITI-PELLIÉ, C.; CHOMPRET, A.; FOULKES, W.; PERUSINGHE, N.; REEVE, A.; ROYER-POKORA, B.; SCHUMACHER, V.; SHELLING, A.; SKEEN, J.; DE TOURREIL, S.; WEIRICH, A.; PRITCHARD-JONES, K.; STRATTON, M. R.; RAHMAN, N. Evidence for susceptibility genes to familial

Wilms tumour in addition to WT1, FWT1 and FWT2. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 2, p. 177-183, 2000.

REINHARD, H.; SCHMIDT, A.; FURTWÄNGLER, R.; LEUSCHNER, I.; RÜBE, C.; VON SCHWEINITZ, D.; ZOUBEK, A.; NIGGLI, F.; GRAF, N. Outcome of relapses of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. **Oncology Reports**, v. 20, n. 2, p. 463-467, 2008.

RINKENBAUGH, A. L.; BALDWIN, A. S. The NF- κ B pathway and cancer stem cells. **Cells**, v. 5, n. 2, p. E16, 2016.

RIVERA, M. N.; HABER, D. A. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. Nature reviews. **Cancer**, v. 5, n. 9, p. 699-712, 2005.

RUTESHOUSER, E. C.; ROBINSON, S. M.; HUFF, V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 47, n. 6, p. 461-470, 2008.

SCHNEIDER, P.; SCHWENZER, R.; HASS, E.; MÜHLENBECK, F.; SCHEURICH, P.; TSCHOPP, J.; WAJANT, H. TWEAK can induce cell death via endogenous TNF and TNF receptor 1. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 6, p. 1785-1792, 1999.

SCHUG, T. T.; BERRY, D. C.; SHAW, N. S.; TRAVIS, S. N.; NOY, N. Dual transcriptional activities underlie opposing effects of retinoic acid on cell survival. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 723-733, 2007.

SCHUMACHER, V.; SCHUHEN, S.; SONNER, S.; WEIRICH, A.; LEUSCHNER, I.; HARMS, D.; LICHT, J.; ROBERTS, S.; ROYER-POKORA, B. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 2005-2014, 2003.

SCIACOVELLI, M.; GUZZO, G.; MORELLO, V.; FREZZA, C.; ZHENG, L.; NANNINI, N.; CALABRESE, F.; LAUDIERO, G.; ESPOSITO, F.; LANDRISCINA, M.; DEFILIPPI, P.; BERNARDI, P.; RASOLA, A. The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 988-999, 2013.

SCOTT, R. H.; STILLER, C. A.; WALKER, L.; RAHMAN, N. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 9, p. 705-715, 2006.

SEBIRE, N. J.; VUJANIĆ, G. M. Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features. **Histopathology**, v. 54, n. 5, p. 516-528, 2009.

SERGERS, H.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; WILLIAMS, R. D.; van TINTEREN, H.; VUJANIĆ, G.; PIETERS, R.; PRITCHARD-JONES, K.; BOWN, N. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' Tumors. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 52, n. 11, p. 1065-1074, 2013.

SHAMBERGER, R. C.; GUTHRIE, K. A.; RITCHEY, M.L.; HAASE, G. M.; TAKASHIMA, J.; BECKWITH, J. B.; D'ANGIO, G. J.; GREEN, D. M.; BRESLOW, N. E. Surgery-related factors and local recurrence of Wilms tumor in National Wilms tumor Study 4. **Annals of Surgery**, v. 229, n. 2, p. 292-297, 1999.

SHAW, N.; ELHOLM, M.; NOY, N. Retinoid acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor β/δ . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41589-41592, 2003.

SHEARER, P.; KAPOOR, G.; BECKWITH, J. B.; TAKASHIMA, J.; BRESLOW, N.; GREEN, D. M. Secondary acute myelogenous leukemia in patients previously treated for childhood renal tumors: a report from the National Wilms tumor Study Group. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 23, n. 2, p. 109-111, 2001.

SI, T.; YANG, G.; QIU, X.; LUO, Y.; LIU, B.; WANG, B. Expression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 and its clinical significance in kidney cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 13090-13095, 2015.

SOLIMINI, N. L.; LUO, J.; ELLEDGE, S. J. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 986-988, 2007.

SONG, H. Y.; DUNBAR, J. D.; ZHANG, Y. X.; GUO, D.; DONNER, D. B. Identification of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3574-3581, 1995.

SPREAFICO, F.; PRITCHARD JONES, K.; MALOGOLOWKIN, M.; BERGERON, C.; HALE, J.; KRAKER, J.; DALLORSO, S.; CAMARGO, B.; DOME, J. S.; GRAF, N. Treatment of relapsed Wilms tumor: lessons learned. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 9, n. 12, p. 1807-1815, 2009.

SREDNI, S. T.; GADD, S.; HUANG, C.; BRESLOW, N.; GRUNDY, P.; GREEN, D. M.; DOME, J. S.; SHAMBERGER, R. C.; BECKWITH, J. B.; PERLMAN, E. J. Subsets of very low risk Wilms tumor show distinctive gene expression, histologic, and clinical features. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 22, p. 6800-6809, 2009.

STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. International variations in the incidence of childhood renal tumours. **British Journal of Cancer**, v. 62, n. 6, p. 1026-1030, 1990.

STILLER, C. A.; PARKIN, D. M. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. **British Medical Bulletin**, v. 52, n. 2, p. 682-703, 1996.
SZAVAY, P.; LUTHLE, T.; GRAF, N.; FURTWÄGLER, R.; FUCHS, J. Primary hepatic metastases in nephroblastoma – a report of the SIOP/GPOH study. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 41, n. 1, p. 168-172, 2006.

STRIMBU, K.; TRAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, 2010.

TAYLOR, A. J.; WINTER, D. L.; PRITCHARD-JONES, K.; STILLER, C. A.; FROBISCHER, C.; LANCASHIRE, E. R.; REULEN, R. C.; HAWKINS, M. M. Second primary neoplasms in survivors of Wilms' tumour – a population-based cohort study from the British Childhood Cancer Survivor Study. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 2085-2093, 2008.

TAYLOR, C. R. Predictive biomarkers and companion diagnostics. The future of immunohistochemistry: 'in situ proteomics', or just a 'stain'? **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 22, n. 8, p. 555-561, 2014.

TERMUHLEN, A. M.; TERSAK, J. M.; LIU, Q.; YASUI, Y.; STOVALL, M.; WEATHERS, R.; DEUTSCH, M.; SKLAR, C. A.; OEFFINGER, K. C.; ARMSTRONG, G.; ROBISON, L. L.; GREEN, D. M. Twenty-five year follow-up of childhood Wilms Tumor: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 57, n. 7, p. 1210-1216, 2011.

THEODOSIOU, M.; LAUDET, V.; SCHUBERT, M. From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. **Cell and Molecular Life Science**, v. 67, n. 9, 1423-1445, 2010.

TORREZAN, G. T.; FERREIRA, E. N.; NAKAHATA, A. M.; BARROS, B. D. F.; CASTRO, M. T. M.; CORREA, B. R.; KREPISCHI, A. C. V.; OLIVIERI, E. H. R.; CUNHA, I. W.; TABORI, U.; GRUNDY, P. E.; COSTA, C. M. L.; DE CAMARGO, B.; GALANTE, P. A. F.; CARRARO, D. M. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nature Communications**, v. 5, p. 4039, 2014.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; VAN TINTEREN, H.; BERGERON, C.; COULOMB-L'HERMINE, A.; DE CAMARGO, B.; LEUSCHENER, I.; SANDSTEDT, B.; ACHA, T.; GODZINSKI, J.; OLDENBURGER, F.; GOOSKENS, S. L.; KRAKER, J.; VUJANIĆ, G. M.; PRITCHARD-JONES, K.; GRAF, N. Outcome of localised blastemal-type Wilms tumour patients treated according to intensified treatment in the SIOP WT 2001 protocol, a report of the SIOP Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 4, p. 498-506, 2015.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. (Ed.). **Wilms tumor**. Australia: Codon Publications, 2016.

VAN WAAS, M.; NEGGERS, S. J. C. M. M.; RAAT, H.; VAN RIJ, C. M.; PIETERS, R.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. Abdominal radiotherapy: a major determinant of metabolic syndrome in nephroblastoma and neuroblastoma survivors. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52237, 2012.

VARAN, A. Wilms' tumor in children: an overview. **Nephron. clinical practice**, v. 108, n. 2, p. c83-c90, 2008.

VUJANIĆ, G. M.; HARMS, D.; SANDSTEDT, B.; WEIRICH, A.; DE KRAKER, J. F. M. New definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumor: the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) experience. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 32, n. 5, p. 317-323, 1999.

VUJANIĆ, G. M.; SANDSTEDT, B.; HARMS, D.; KELSEY, A.; LEUSCHNER, I.; DE KRAKER, J. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 38, n. 2, p. 79-82, 2002.

VUJANIĆ, G. M. Renal tumours of childhood: an overview. **Diagnostic Histopathology**, v. 15, n. 11, p. 501-509, 2009.

WEEKS, D. A.; BECKWITH, J. B.; LUCKEY, D. W. Relapse-associated variables in stage I favorable histology Wilms' tumor. A report of the National Wilms' tumor Study. **Cancer**, v. 60, n. 6, p. 1204-1212, 1987.

WEGERT, J.; BAUSENWEIN, S.; KNEITZ, S.; ROTH, S.; GRAF, N.; GEISSNER, E.; GESSLER, M. Retinoic acid pathway activity in Wilms tumors and characterization of biological responses in vitro. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 136, 2011.

WEIRICH, A.; LEUSCHNER, I.; HARMS, D.; VUJANIĆ, G. M.; TRÖGER, J.; ABEL, U.; GRAF, N.; SCHMIDT, D.; LUDWIG, R.; VOÛTE, P. A. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. **Annals of Oncology**, v. 12, n. 3, p. 311-319, 2001.

WEIRICH, A.; LUDWIG, R.; GRAF, N.; ABEL, U.; LEUSCHNER, I.; VUJANIĆ, G. M.; MEHLS, O.; BOOS, J.; BECK, J.; ROYER-POKORA, B.; VOÛTE, P. A. Survival in nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH with respect to relapse and morbidity. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 5, p. 808-820, 2004.

WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 10, 761-772, 2005.

WILEY, S. R.; CASSIANO, L.; LOFTON, T.; SMITH, T. D.; WINKLES, J. A.; LINDNER, V.; LIU, H.; DANIEL, T. O.; DAVIS-SMITH, C. A. FANSLAW, W. C. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 837-846, 2001.

WILLIAMS, R. D.; CHAGTAI, T.; ALCAIDE-GERMAN, M.; APPS, J.; WEGERT, J.; POPOV, S.; VUJANIĆ, G.; VAN TINTEREN, H.; VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M.; KOOL, M.; DE KRAKER, J.; GISSELSSON, D.; GRAF, N.; GESSLER, M.; PRITCHARD-JONES, K. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. **Oncotarget**, v. 6, n. 9, p. 7232-7243, 2015.

WILMS, M. **Die Mischgeschwülste der Niere**. Leipzig: Verlag von Arthur Georgi, 1899.

WINKLES, J. A. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 7, n. 5, p. 411-425, 2008.

WITTMANN, S.; ZIRN, B.; ALKASSAR, M.; AMBROS, P.; GRAF, N.; GESSLER, M. Loss of 11q and -16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence and poor prognosis. **Genes, chromosome & cancer**, v. 46, n. 2, p. 163-170, 2007.

WU, D.; WU, P.; ZHAO, L.; HUANG, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, S.; HUANG, J. NF- κ B expression and outcomes in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v. 94, n. 40, e1687, 2015.

XIE, T. X.; XIA, Z.; ZHANG, N.; GONG, W.; HUANG, S. Constitutive NF- κ B activity regulates the expression of VEGF and IL-8 and tumor angiogenesis of human glioblastoma. **Oncology Reports**, v. 23, n. 3, p. 725-732, 2010.

YANG, Q.; WANG, R.; XIAO, W.; SUN, F.; YUAN, H.; PAN, Q. Cellular retinoic acid binding protein 2 is strikingly downregulated in human esophageal squamous cell carcinoma and functions as a tumor suppressor. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0148381.

YOSHIDA, S.; TSUTSUMI, S.; MUHLEBACH, G.; SOURBIER, C.; LEE, M. J.; LEE, S. VARTHOLOMAIOU, E.; TATOKORO, M.; BEEBE, K.; MIYAJIMA, N.; MOHNEY, R. P.; CHEN, Y.; HASUMI, H.; XU, W.; FUKUSHIMA, H.; NAKAMURA, K.; KOGA, F.; KIHARA, K.; TRPEL, J.; PICARD, D.; NECKERS, L. Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, E1604-E1612, 2013.

ZHANG, B.; WANG, J.; HUANG, Z.; WEI, P.; LIU, Y.; HAO, J.; ZHAO, L.; ZHAO, L.; ZHANG, F.; TU, Y.; WEI, T. Aberrantly upregulated TRAP1 is required for tumorigenesis of breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 42, p. 44495-44508, 2015.

ZHANG, Z.; MA, J.; LI, N.; SUN, N.; WANG, C. Expression of nuclear factor- κ B and its clinical significance in nonsmall-cell lung cancer. **The Annals of thoracic surgery**, v. 82, n. 1, p. 243-248, 2006.

ZHI, Y.; DUAN, Y.; ZHOU, X.; YIN, X.; GUAN, G.; ZHANG, H.; DONG, Q.; YANG, K. NF- κ B signaling pathway confers neuroblastoma cells migration and invasion ability via the regulation of CXCR4. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 2746-2752, 2014.

ZIRN, B.; HARTMANN, O.; SAMANS, B.; KRAUSE, M.; WITTMANN, S.; MERTENS, F.; GRAF, N.; EILERS, M.; GESSLER, M. Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 8, p. 1954-1962, 2006.

**ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de mTor, CRABP2 e NF-kB em tumores de Wilms

Pesquisador: Ana Paula Percicote

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 05823013.1.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia

Patrocinador Principal: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR
Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 308.931

Data da Relatoria: 18/06/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto já avaliado e aprovado por este comitê. O projeto foi modificado com a exclusão dos co-participantes Hospitais Pequeno Príncipe e Erasto Gaertner. As amostras de tumor de Wilms serão provenientes do Hospital das Clínicas da UFPR. Trata-se de projeto de Doutorado sob orientação da Profa. Dra. Lúcia de Noronha. Serão selecionadas lâminas histológicas em hematoxilina-eosina de tumores de Wilms de sujeitos tratados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná diagnosticados durante o período de 1990 e 2012, após a submissão nos Comitês de Ética da instituição. As vias m-Tor, ácido retinóico e NF- κ B estão envolvidas na carcinogênese de uma série de neoplasias e são potenciais alvos terapêuticos atualmente em investigação, não tendo sido estudadas ainda em tumores de Wilms.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão imunoistoquímica tecidual da m-Tor, CRABP2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 e IKK em amostras parafinadas de tumores de Wilms através da técnica de imunoistoquímica, correlacionando-a com a evolução clínica dos pacientes e com as variáveis clínico-patológicas do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos sujeitos da pesquisa são mínimos. Do ponto de vista ético, eles ocorrem pelo acesso

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

Continuação do Parecer: 308.931

a dados do prontuário, sendo a confidencialidade assegurada pelo Termo de Compromisso de Utilização de Dados. Os benefícios da pesquisa em termos de conhecimento da fisiopatologia do tumor de Wilms, além da compreensão do porque há a recidiva ou evolução desfavorável em alguns sujeitos são grandes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores solicitaram a dispensa do TCLE. Os documentos Termo de Guarda de Material Biológico, Termo de Compromisso de Utilização de Dados, além dos demais documentos estão presentes.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se de acordo com a legislação vigente. A dispensa do TCLE é justificada. Não vemos empecilho para a continuidade do projeto. O Hospital das Clínicas já teve acesso à versão anterior do parecer deste comitê de ética e concordou, como co-participante, com a continuidade da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 308.931

CURITIBA, 19 de Junho de 2013

Assinador por:
Claudia Seely Rocco
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**ANEXO 2 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA LIGA PARANAENSE DE
COMBATE AO CÂNCER**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de mTor, CRABP2 e NF-kappaB em tumores de Wilms.

Pesquisador: Ana Paula Percicote

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 16727213.0.0000.0098

Instituição Proponente: Hospital Erasto Gaertner

Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 342.729

Data da Relatoria: 21/05/2013

Apresentação do Projeto:

aceito

Objetivo da Pesquisa:

aceito

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

aceito

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

aceito

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

aceito

Recomendações:

aceito

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201

Bairro: Jardim das Américas

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3218-0324

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br

LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 342.729

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Curitiba, 28 de Maio de 2013.

Ana Paula Percicote
Pesquisador Responsável

Prezado (a) Pesquisador,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: *Expressão de mTor, CRABP2 e NF-kappaB em tumores de Wilms.* cujo número de protocolo é P.P. nº 2269 e tem como pesquisador responsável V. Sa. Foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e ficou APROVADO

Sem mais para o momento, agradecemos à atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br

LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER



Continuação do Parecer: 342.729

Coordenador do CEP
Dr. Jordan Zanetti Silva

CURITIBA, 29 de Julho de 2013

Assinador por:
Jordan Zanetti Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Dr. Ovide do Amaral 201
Bairro: Jardim das Américas
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3218-0324

CEP: 81.520-060

E-mail: cep@lpcc.org.br

**ANEXO 3 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DE CRIANÇAS
CÉSAR PERNETTA E HOSPITAL PEQUENO PRÍNCIPE**

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão imunoistoquímica em tumores de Wilms.

Pesquisador: Ana Paula Percicote

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16728513.1.0000.0097

Instituição Proponente: ASSOCIACAO HOSPITALAR DE PROT INFANCIA DR RAUL CARNEIRO

Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 346.763

Data da Relatoria: 01/08/2013

Apresentação do Projeto:

Expressão de mTor, CRABP2 e NF-kappaB em tumores de Wilms.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão imunoistoquímica tecidual da m-Tor, CRABP2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 e IKK em amostras parafinadas de tumores de Wilms através da técnica de imunoistoquímica, correlacionando-a com a evolução clínica dos pacientes e com as variáveis clínico-patológicas do estudo.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a expressão imunoistoquímica da m-Tor, CRABP2, NF-kappaB-p65, NF-kappaB-p50 e IKK em amostras parafinadas de tumor de Wilms.2.

Avaliar se existe correlação entre a expressão imunoistoquímica de m-Tor, CRABP2, NF-kappaB-p65, NFkappaB-p50 e IKK e a evolução clínica

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070

Bairro: Água Verde

CEP: 80.250-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41-)3310-1416

Fax: (41-)3310-1416

E-mail: comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br

Continuação do Parecer: 346.763

dos pacientes e fatores prognósticos mais relevantes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos.

Benefícios:

A expressão destas proteínas não é descrita na literatura em tumores de Wilms e estes marcadores estão associados a terapia alvo específica que poderiam se tornar alternativas para o tratamento de casos de recidiva e doença metastática.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tumor de Wilms é a neoplasia renal mais freqüente na faixa etária pediátrica e apesar do excelente prognóstico alguns pacientes evoluem com recidiva da neoplasia e redução da sobrevida (REINHARD et al., 2008). A organização de grupos de estudo sobre o tumor de Wilms tem como principais objetivos compreender a patogênese do tumor, melhorar a sobrevida dos pacientes, reduzir efeitos colaterais e recidivas, reduzir o impacto psicossocial ao paciente e a sua família e os custos do tratamento médico. Trata-se, portanto, de um estudo que investiga uma patologia o tumor de Wilms - ou nefroblastoma que é a neoplasia renal mais comum na faixa etária pediátrica e corresponde a 5 a 7% dos cânceres pediátricos e a 98% dos cânceres renais em crianças -; que é relevante do ponto de vista epidemiológico, merecendo ser estudada por apontar a obtenção de benefícios terapêuticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência: no orçamento financeiro aparece custo de R\$ 10.000,00. Detalhar a fonte de financiamento do projeto.

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070

Bairro: Água Verde

CEP: 80.250-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41-)3310-1416

Fax: (41-)3310-1416

E-mail: comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br

HOSPITAL DE CRIANÇAS
CÉSAR PERNETTA E
HOSPITAL PEQUENO



Continuação do Parecer: 346.763

Resposta: O financiamento será provido pela Universidade Federal do Paraná e Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Ressaltando que os anticorpos, necessários para a imunoistoquímica, descritos na pesquisa já foram comprados, testados e padronizados. Pendência atendida.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que conforme as normas da CONEP/MS o pesquisador deverá enviar ao CEP relatórios semestrais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador em caso de relevância. Salientamos ainda a necessidade do envio do relatório final do estudo.

CURITIBA, 01 de Agosto de 2013

Assinador por:
NILTON KIESEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Desembargador Motta, nº 1070

Bairro: Água Verde

CEP: 80.250-060

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41-)3310-1416

Fax: (41-)3310-1416

E-mail: comissao.etica.pesquisa@hpp.org.br